

T H E S E

PRÉSENTÉE

DEVANT L' UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD-LYON

pour obtenir

le grade de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Michel BOUNIAS

ETUDE BIOCHIMIQUE ET CYTOCHIMIQUE DE
L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE CHEZ DES
VEGETAUX SUPERIEURS NORMAUX ET MUTES

Soutenue le 13 mai 1972 devant la Commission d'Examen

Mlle

GAUTHERON

Président

MM

PACHECO
LEBRETON

Examineurs

COSTES

Membre invité

T H E S E

PRESENTEE

DEVANT L' UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD-LYON

pour obtenir

le grade de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Michel BOUNIAS

ETUDE BIOCHIMIQUE ET CYTOCHIMIQUE DE L' APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE CHEZ DES VEGETAUX SUPERIEURS NORMAUX ET MUTES

Soutenue le 13 mai 1972 devant la Commission d'Examen

Mlle

GAUTHERON

Président

MM

PACHECO
LEBRETON

}

Examineurs

COSTES

Membre invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN.

1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé.

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant.

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

E.R. médicale Grange-Blanche

M. le Professeur D. GERMAIN

E.R. médicale Alexis-Carrel

M. le Professeur C. GIROD

E.R. médicale LYON-Nord

M. le Professeur A. BERTOYE

E.R. médicale LYON-Sud-Ouest

M. le Professeur L. TOLOT

E.R. des Sciences pharmaceutiques

M. M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé

E.R. des Techniques de Réadaptation

M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN

E.R. de Biologie humaine

M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé

Institut Régional d'Education Physique
et Sportive

M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.

E.R. de Mathématiques

M. le Doyen J. BRACONNIER

E.R. de Physique

M. le Professeur M. DUFAY

E.R. de Chimie et Biochimie

M. le Professeur D. GAUTHERON

E.R. des Sciences de la Nature

M. le Professeur L. DAVID

E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie

M. le Professeur J. CHANEL

E.R. de Physique nucléaire

M. le Professeur A. SARAZIN

Institut Universitaire de Technologie I

M. le Professeur L. FEUVRAIS

Institut Universitaire de Technologie II

M. J. GALLET

Observatoire

M. le Professeur J.H. BIGAY

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE

Je tiens à exprimer ma profonde et respectueuse reconnaissance à Mademoiselle GAUTHERON, Professeur à l'Université Claude Bernard - Lyon, Directrice de l'UER de Chimie-Biochimie, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail et de présider mon jury.

Cette thèse a été préparée sous le patronage scientifique de Monsieur le Professeur PACHECO, Directeur du Service de Biochimie de l'INSA-LYON. Je voudrais qu'il trouve ici l'expression de ma très sincère gratitude pour la bienveillance avec laquelle il a guidé mes travaux ; son enseignement et ses nombreux conseils ont agi, à chaque étape de mes recherches comme autant de "catalyseurs".

Monsieur le Professeur LEBRETON a bien voulu s'intéresser à ce travail et accepter de faire partie de mon jury. Je tiens à lui témoigner mes plus vifs remerciements pour les précieux conseils qu'il m'a prodigués.

J'adresse également ma respectueuses gratitude à Monsieur COSTES, Directeur du laboratoire de Recherches de la Chaire de Chimie Biologique de l'ENSA de GRIGNON, dont les encouragements, au cours de mon travail, ont été pour moi un soutien précieux.

Mon "parrain" de thèse, Monsieur le Docteur KHAU-VAN-KIEN, a suivi pas à pas l'avancement de mon travail. Je tiens à lui exprimer ma très sincère reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée ainsi que pour les nombreux conseils et encouragements qu'il m'a toujours prodigués.

ETUDE BIOCHIMIQUE ET CYTOCHIMIQUE
DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE
CHEZ DES VEGETAUX SUPERIEURS NORMAUX ET MUTES*

RESUME - L'Objectif de ce travail est la caractérisation biochimique et physiologique de diverses catégories de mutations chlorophylliennes radio-induites de végétaux supérieurs, et la recherche de particularités spécifiques des différents mutants en vue d'aboutir à la découverte d'un mécanisme plus général dont les applications devront permettre d'obtenir leur reverdissement expérimental.

Trois étapes successives ont donc été franchies, depuis l'analyse approfondie des mutants jusqu'au contrôle de leur reverdissement.

La mise au point d'un ensemble de microtechniques quantitatives nous a permis d'effectuer l'analyse biochimique et radiochimique des pigments chlorophylliens et caroténoïdes, des sucres et amino-acides libres à partir d'échantillons de très faible taille, avec comme matériel végétal l'Orge (monocotylédone) et l'Arabidopsis (dicotylédone). Les principaux mutants étudiés sont de type "Viridis", présentant des degrés de viabilité décroissante.

• Au cours de la première partie du travail, les divers métabolites retenus comme critères biochimiques ont été analysés et comparés chez les plants normaux et mutés au cours de leur développement, dans des conditions normales de cultures, ainsi que sous l'effet de traitements physiologiques connus pour pouvoir modifier l'expression des mutations : lumière atténuée, basse température, ablation de la feuille cotylédonnaire.

L'ensemble de ces expériences a permis d'établir les principales relations physiologiques existant entre les pigments chlorophylliens et caroténoïdes, les sucres et les amino-acides libres ; les limites de ces variations ont été précisées grâce à l'étude de quelques mutants particulièrement appauvris en chlorophylles et caroténoïdes (types "Xantha" et "Albina").

Il est apparu, ainsi, que les amino-acides libres varient en fonction inverse des teneurs en chlorophylles et sont donc normalement plus abondants chez les mutants que chez les plants normaux. Nous avons également noté, l'importance particulière des variations de teneurs en Leucine au cours de diverses altérations chlorophylliennes et l'existence de relations spécifiques entre cet amino-acide et les principaux caroténoïdes. D'autre part, les traitements au froid et en lumière atténuée ont permis de mieux connaître le rôle de certains composés, très importants pour l'étude des mutants, tels que les formes actives et de réserve de composés intervenant dans les chaînes d'oxydoréduction et phosphorylation (plastoquinones et chroménols).

Ces observations nous ont permis de faire un premier rapprochement -en particulier grâce à un mutant d'Arabidopsis- entre une carence en Leucine et Iso-leucine, une accumulation anormale de chroménol-phosphorylé (forme active) et une augmentation parallèle d'activité phosphatasique alcaline.

* Travaux réalisés dans le cadre d'une bourse-thèse de Doctorat d'Etat ès sciences Naturelles au CEN/Cadarache, DB/SRA, Laboratoire d'Histo-chimie - Autoradiographie.

• Au cours de la 2ème partie du travail, nous avons précisé certains aspects dynamiques du métabolisme des plants d'Orge normaux et mutés en suivant la cinétique d'incorporation de l'Acétate- $l-^{14}C$ dans leurs pigments, sucres et amino-acides. Cette étude a montré, en particulier, que la leucine se marque plus que l'iso-leucine, que le métabolisme des chlorophylles est plus lent chez les mutants, et que ces derniers réalisent, d'autre part, une rétro-synthèse des sucres à partir de l'acétyl-Co. A, compensant ainsi leur défaut de photosynthèse.

Des expériences de reverdissement après étiolement obscur ont montré que les processus d'oxydo-réduction des Xanthophylles (mécanismes reliés à l'activité phosphatasique) peuvent être altérés irréversiblement chez les deux mutants viridis les moins viables, avec apparition d'un dérivé nouveau, voisin de la lutéine et accumulation de la forme de réserve des cofacteurs de type chroménols ; dans ce cas, la leucine ne réagit plus en fonction inverse des teneurs pigmentaires.

Plusieurs effets caractéristiques des mutations ont été reproduits artificiellement grâce à l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de certaines réactions métaboliques : ces expériences ont fait apparaître, en particulier, une relation physiologique entre les troubles de l'équipement photosynthétique et ceux de la synthèse d'ARN, se traduisant, lors de nos essais, par l'apparition anormale d'un dérivé polaire du β carotène. Un pigment nouveau, de la même famille, est aussi apparu chez les témoins et certains mutants sous l'effet d'un inhibiteur de la photophosphorylation : le p.C.M.B. (*) récemment décrit comme également inhibiteur de l'activité phosphatasique alcaline. Parmi les troubles apparus en même temps, il faut souligner, à nouveau, une forte accumulation d'amino-acides, et en particulier de leucine.

Une série d'expériences d'histochimie a montré, alors, que la localisation des amino-acides dans les chloroplastes est compatible avec celle de l'activité phosphatasique et ATPasique, et surtout que la leucine y est parfois extrêmement concentrée, au point de cristalliser "in situ" sous l'effet d'agents déshydratants doux. Ces observations ont été confirmées par l'analyse biochimique des amino-acides dans des fractions hautement purifiées de chloroplastes et d'éléments cytoplasmiques.

Enfin, l'accumulation de formes glucidiques de réserve (principalement le saccharose) n'a été obtenue que dans les cas d'atteinte de la glycolyse (aérobie et anaérobie) et de la synthèse d'ARN : elle est le signe d'une altération profonde du métabolisme.

• L'ensemble des résultats précédents nous a conduit, dans la troisième partie, à découvrir le rôle de la L-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline, avec activation à très faibles doses, suivie d'une inhibition à doses plus élevées. De même, l'incorporation artificielle de leucine à doses croissantes dans les plantes normales a montré, d'abord, une stimulation de l'équipement chlorophyllien correspondant à une phase d'absorption exponentielle, suivie d'une altération croissante de l'appareil photosynthétique au-delà d'un seuil de concentration intra-cellulaire, à partir duquel l'absorption de leucine tend vers une asymptôte. Dans ce cas, la leucine produit les mêmes effets que le p.C.M.B., avec accumulation du dérivé polaire du carotène : le point commun entre ces deux effecteurs se situe au niveau de l'activité phosphatasique.

La pénétration de leucine (U)- ^{14}C dans les chloroplastes a été confirmée par autohistoradiographie, et son rôle sur l'activité phosphatasique et ATPasique a été vérifié au niveau des chloroplastes

(*) para-Chloro-Mercuri-Benzozate

par voie histochimique.

Les propriétés de la leucine ont pu être appliquées aux divers mutants d'Orge et d'Arabidopsis, avec, chaque fois, l'obtention d'un verdissement accru sous l'effet des doses stimulantes. Dans plusieurs cas, il a même été possible de mettre le reverdissement, en relation directe avec une rectification de l'activité phosphatasique alcaline, un rétablissement des teneurs en formes actives de chroménols et une stimulation de l'incorporation de leucine (U)- ^{14}C dans les pigments photosynthétiques.

Ce travail aura donc permis, en définitive, de montrer plusieurs aspects nouveaux du rôle de la leucine dans la régulation du fonctionnement de l'appareil photosynthétique, grâce à l'utilisation de plusieurs mutants chlorophylliens ayant été, au préalable soigneusement étudiés.

ABREVIATIONS UTILISEES

Act. Sp.	: Activité Spécifique
ADP	: Adénosine Di-Phosphate
AIA	: Acide Indolyl-3 Acétique
ATP	: Adénosine Tri-Phosphate
Chl.	: Chlorophylle
Ci	: Curie
D. O.	: Densité Optique
FAD	: Flavine-Adénine Di-Nucléotide
FMN	: Flavine-Mono-Nucléotide
HEPES	: Tampon Hydroxy-Ethyl-Pipérazine-Etyl-Sulfonate
HT	: Hors Texte
L. A.	: Lumière Atténuée
L. N.	: Lumière Normale
Lut.	: Lutéine
MN-MA	: Mutants en L. N. - Mutants en L. A.
M	: Mole
N.	: Normal
Néo-Xanth.	: Néo-Xanthine
nM	: nano-Mole (10^{-9} M.)
nm	: nano-mètre (= mμ, longueur d'onde)
NAD	: Nicotine-Adénine Di-nucléotide
NBT	: Nitro-Bleu-Trétrazolium
pNP	: para. Nitro Phénol
pNPP	: para Nitro-Phényl-Phosphate
PQ	: Plasto-Quinone
PCMB	: Para-Chloro-Mercuri-Benzoate
T.	: Témoins
THF	: Acide Tétrahydro-Folique
TRIS	: Tampon Tris-(hydroxyméthyl)-pipérazine-Sulfonate
u. i.	: unités d'intégration (surfaces de pics enregistrés)
Viola-X.	: Viola-xanthine
ε	: faible quantité ou trace (non mesurable)
λ	: longueur d'onde

Les amino-acides sont conventionnellement désignés par les 3 premières lettres de leur nom (ex. Leu : Leucine), sauf :

Ac.α (ou γ)	Am. But.	: Acide α (ou γ) Amino Butyrique
Asp-NH ₂ , Glu-NH ₂		: Asparagine, Glutamine
I-Leu		: Iso-Leucine

PLAN

INTRODUCTION

MATERIEL ET TECHNIQUES

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIOCHIMIQUE DE PLANTS D'ORGE ET D'ARABIDOPSIS NORMAUX ET MUTES

- I - Etude sur des rosettes de feuilles d'Arabidopsis normales et mutées
- II - Etude sur des Plantules d'Orge normales et "Viridis"
- III - Etude de quelques mutations chlorophylliennes plus avancées chez l'Orge

DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES SUR LE MECANISME DE QUELQUES TROUBLES METABOLIQUES DETECTES CHEZ DIVERS MUTANTS

- I - Etude de quelques phénomènes de reverdissement chez l'Orge
- II - Etude comparée de l'incorporation d'Acétate- $l-^{14}C$, dans les plants d'Orge normaux et "Viridis"
- III - Recherches préliminaires sur la localisation cellulaire de quelques phénomènes métaboliques
- IV - Etudes physiologiques à l'aide d'inhibiteurs spécifiques du métabolisme chez les plantes normales et mutées

TROISIEME PARTIE : RECHERCHES SUR LE ROLE DES AMINO-ACIDES DANS LA REGULATION DU FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE

- I - Double effet de l'absorption cellulaire de L. leucine sur l'équipement photosynthétique chez l'Orge
- II - Effets inhibiteurs de la L. Leucine et de la DL-Aza-leucine sur l'équipement photosynthétique de l'Orge et l'Arabidopsis
- III - Action de la L. Leucine sur la stimulation du verdissement des plants d'Orge et d'Arabidopsis normaux et mutés
- IV - Effets de la L. Leucine et l'Aza-leucine sur l'activité phosphatase alcaline de plants d'Orge normaux et mutés.

DISCUSSION GENERALE

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

HORS-TEXTE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

L'étude des effets biologiques des rayonnements ionisants a déjà fait l'objet de très nombreux travaux (219) dont une bonne part est encore consacrée à la mutagénèse expérimentale chez les végétaux supérieurs : ces recherches conduisent à la production de mutants très divers, dont certains présentent des anomalies morphologiques, d'autres des modifications biochimiques et parfois les deux associées.

De nombreuses mutations se manifestent sous la forme d'altérations ou de modifications de l'équipement photosynthétique ou de son fonctionnement (54) : elles sont généralement désignées sous le nom de mutations chlorophylliennes.

Nos recherches ont eu pour point de départ la comparaison par voie biochimique, de diverses catégories de mutants chlorophylliens de végétaux supérieurs souvent difficiles à caractériser par les méthodes génétiques. Puis, compte tenu de l'intérêt que présentent de tels mutants pour l'étude de la Photosynthèse (78), (151), nous avons tenté d'utiliser leurs propriétés biochimiques pour aborder l'étude fondamentale d'un mécanisme de fonctionnement de l'appareil photosynthétique, avec comme idée directrice, la recherche d'une possibilité d'induction du reverdissement des mutants.

Pour ce travail, nous avons utilisé plusieurs mutants chlorophylliens d'Arabidopsis (monocotylédone) et d'Orge (dicotylédone) ne présentant aucune autre modification importante décelable (en particulier de nature morphologique ou histologique).

Trois étapes principales ont été nécessaires pour atteindre les objectifs que nous nous étions fixés :

La première consiste en une description biochimique précise de chaque mutant par rapport aux plants normaux pris dans les mêmes conditions.

La seconde est orientée vers la recherche de caractéristiques biochimiques particulières propres à améliorer la définition des mutations et à faire apparaître des réactions physiologiques nouvelles.

La troisième partie, enfin, est consacrée à l'étude biochimique d'un mécanisme de régulation du fonctionnement de l'appareil photosynthétique découvert grâce à l'apport de nos résultats précédents, et qui débouche sur une application au contrôle du verdissement des mutants et des plants normaux.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I - Caractéristiques Biochimiques des mutants chlorophylliens

CHAPITRE II - Orientation de nos recherches

CHAPITRE I

CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DES MUTANTS CHLOROPHYLLIENS

INTRODUCTION Les mutations chlorophylliennes sont classées selon GUSTAFSSON, 1938 (97) en trois catégories fondamentales : "Viridis", "Xantha" et "Albina" (avec divers intermédiaires possibles) en fonction des degrés croissants d'altération de l'équipement pigmentaire et du plastidome.

Les conséquences biochimiques de ces mutations sont encore relativement mal connues, mais, depuis les premières recherches de GRANDSIRE en 1926 (91), divers travaux commencent, maintenant, à paraître régulièrement dans ce domaine : les plus fréquents concernent l'analyse des pigments, et certains se rapportent déjà à l'étude des amino-acides, des sucres, des vitamines et des enzymes.

A - PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS ET CAROTENOÏDES

Les travaux de KOSKI et SMITH, 1951 (136), NYBOM 1955 (179), SMITH et al. 1959 (217), LEFORT, 1959 (152), WHITAKER 1962 (246) et JAIN 1966 (118) montrent que les mutants "Viridis" contiennent en moyenne 65 % de la teneur normale en chlorophylles et 50 à 95 % de la teneur normale en caroténoïdes. Ces teneurs diminuent chez les "Xantha" jusqu'à atteindre respectivement 15 % pour les chlorophylles et 18 à 46 % pour les caroténoïdes. Enfin, les "Albina" renferment de 0 à 5 % de chlorophylles et de 1,5 à 6 % de caroténoïdes par rapport aux plants normaux.

Le rapport $\frac{\text{chl. (a)}}{\text{chl. (b)}}$ peut varier à l'infini, se rapprochant de la normale chez les "Viridis" viables (GOTTSCALK et MULLER, 1964) (89) et même létaux (SCHWARTZ, 1949) (205). Ce rapport est voisin de zéro chez certains "Albina", alors que divers mutants de Maïs (SCHWARTZ, 1949) (205), d'Orge (HIGKIN, 1950 (104) et 1962 (105)), d'Arabidopsis (ROBBELEN 1957) (193), sont totalement dépourvus de chlorophylle (b) et, le plus souvent, létaux. GOTTSCALK et MULLER (89) ont noté que tous leurs mutants contenant moins de 10 % de la teneur normale en chlorophylles sont létaux. Plus récemment, KASYANENKO et NASYROV, 1968 (114) ont décrit un mutant d'Arabidopsis pauvre en carotène et en violaxanthine, mais contenant beaucoup plus de chlorophylles que les plants normaux, ce qui constitue une forme de déséquilibre assez rare.

FALUDI-DANIEL, NAGY et NAGY, 1969 (68) ont analysé deux mutants de Maïs contenant respectivement du lycopène et du β -carotène :

...

ces auteurs ont recherché les corrélations entre le taux de chlorophylles (a) et le rapport (a)/(b) chez les plants normaux, et chez les mutants à lycopène et à β -carotène. Des variations qualitatives de la composition en pigments caroténoïdes ont été observées par WARNER et Coll., 1969 (240) sur un mutant d'Orge "Virido-Xantha", par LANG et Coll., 1969 (142) sur des mutants de Maïs, et par FORK, 1969 (73) qui a envisagé, en particulier, la participation des caroténoïdes à la photosynthèse.

Les variations de teneurs pigmentaires des mutants se traduisent parfois différemment selon les conditions physiques, et nous verrons, au chapitre II, comment la lumière et la température peuvent modifier l'expression biochimique de certaines mutations.

B - AMINO-ACIDES

Les mutants de tomate "Xantha" étudiés par LEFORT et al., 1958 (153) présentaient une teneur accrue en amino-acides, en particulier : acides aspartique et glutamique, alanine, sérine et glycocolle, qui sont, de plus, fortement marqués après absorption par la plante de $^{14}\text{CO}_2$. De même, des mutants "Xantha" de Blé de printemps, analysés par FERDRIZET et al., 1965 (184) contenaient vingt fois plus de proline, quatre à huit fois plus de leucine, isoleucine, lysine, histidine, arginine, et trois fois plus de tyrosine, valine et phényl-alanine que les plants normaux. En 1961, FUJII et ONO (75) notaient une évolution des teneurs en azote aminé liée au degré de développement des chloroplastes chez des mutants de Blé. Puis, en 1963, MAC LACHLAN et ZALIC (158), examinant le métabolisme protéique chez un mutant d'Orge "Viridis", ont constaté que les plantules étiolées, pauvres en protochlorophylles, présentaient une teneur accrue en amino-acides libres (sérine surtout) en corrélation avec une altération des lipoprotéines chloroplastiques. De même, JAIN, 1966 (118) a observé chez deux mutants d'Orge de type "Viridis" et "jaune-virescens" (un "Xantha" reverdissant après maturité) une teneur très élevée en acide glutamique, valine et sérine ainsi qu'une évolution de la concentration totale en amino-acides libres de sens opposé à celle du taux des chlorophylles, au cours du temps. Chez l'Arabidopsis, VELEMINSKY et al., 1965 (234) puis SVACHULOVA, 1967 (225) ont décrit des mutants "Viridis" riches en amino-acides libres, et en particulier leurs amides : glutamine et asparagine. Enfin, l'analyse nutritionnelle a permis à ERIKSSON et al., 1961 (62) d'isoler un mutant d'Orge "Albina" auxotrophe pour l'acide aspartique et un mutant "Xantha" nécessitant un apport de leucine pour sa survie. De même, REDEI, 1963 (190) a pu isoler un mutant d'Arabidopsis "Albina" auxotrophe pour la cystéine.

C - SUCRES

Dès 1880, SAPOSCHNIKOFF (200) notait, sur diverses plantes à feuilles panachées, que la formation d'amidon était impossible à partir de fructose et de galactose si le milieu de culture ne contenait pas de glucose. EYSTER, 1924 (65) a obtenu des mutants de Maïs "Xantha" létaux, présentant, à leur mort, une accumulation de glucose et de maltose non utilisés. SPOEHR et GORHAM, 1933 (220), ont pu rendre viables des mutants "Albina" de Maïs en leur fournissant du saccharose par les feuilles : ces plants ne pouvaient former d'amidon à partir des hexoses, mais seulement à partir des diosides. De même, les mutants de Tomate "Xantha" de LEFORT et al., 1958 (153) présentaient une formation d'amidon ralentie, et, simultanément, une difficulté à dissocier le saccharose en glucose et fructose.

...

Chez l'Arabidopsis, LANGRIDGE, 1958 (145) a restauré la fertilité de mutants "Albina" et "Viridis" en leur fournissant du glucose ou du saccharose. Enfin, HIGKIN et FRENKEL, 1962 (105) ont observé chez des mutants d'Orge "Albina" une diminution de teneur en saccharose et en sucres réducteurs solubles. Réciproquement, divers travaux dont ceux de DURANTON, 1964 (60 b), MOYSE 1966 (172) et SCHANTZ, 1967 (202) font maintenant état d'une influence des glucides sur la photosynthèse.

D - VITAMINES ET ENZYMES

L'analyse nutritionnelle a permis d'isoler chez l'Arabidopsis des mutants auxotrophes pour la thiamine (LANGRIDGE, 1955 (143), REDEI, 1962 (189), FEENSTRA, 1965 (70)). Le même type de mutation a été obtenu par STUBBE, 1957 (224 a) et 1959 (224 b), LANGRIDGE et BROCK, 1961 (148), puis BOYNTON, 1967 (28) chez la Tomate. Cette mutation affecte la biosynthèse de la vitamine B₁ au niveau du mécanisme de phosphorylation permettant d'associer la partie thiazolique au noyau pyrimidique : il est remarquable de constater que les mêmes mutants ont été obtenus chez l'Arabidopsis à partir de mutagènes très différents, tels que les rayons X, ou le Méthane Sulfonate d'Ethyle.

HOFFMANN a entrepris dès 1965 l'étude des vitamines K, et autres quinones chez l'Arabidopsis : cet auteur pense que leur étude chez des mutants chlorophylliens pourrait fournir une contribution importante à l'étude de la photosynthèse.

HALLIER, 1966 (98) a étudié les transporteurs d'électrons chez des mutants létaux d'Oenothera suaveolens de type "Viridis" virant très tôt au type "Albina"/"Xantha". Les déficiences dans la synthèse d'ATP et de NADP semblaient provenir d'un défaut de certains cofacteurs, dans la chaîne de transfert d'électrons. BARR, HUANG et CRANE, 1965 (12) ont recherché la distribution des diverses plastoquinones dans quelques mutants de Blé. Ils ont montré qu'il pouvait exister des différences qualitatives chez les "Albina" (dépourvus de P.Q.B,C,D) et quantitatives chez des "Xantha" (avec accumulation de P.Q.A.).

RUBIN et coll., 1965 (196) ont montré que des tissus albinos de végétaux supérieurs contenaient plus de FAD et moins de FMN que les tissus verts ; leurs activités NAD-Cytochrome (C)-réductase et succinate-deshydrogénase étaient également réduites.

Enfin, notons l'étude de CHIA-YIN-TSAI et NELSON, 1966 (44) qui ont montré que des mutants de Maïs à faible teneur en amidon étaient presque totalement dépourvus d'activité gluco-kinasique.

CHAPITRE II

ORIENTATION DE NOS RECHERCHES

INTRODUCTION

La bibliographie générale a montré l'intérêt que présente l'analyse des pigments, des amino-acides et des sucres chez les mutants chlorophylliens. De plus, ces divers éléments étant reliés entre eux par les réactions du métabolisme intermédiaire, en cas de perturbation dans une chaîne de biosynthèse, certains vont se raréfier alors que leurs précurseurs situés avant le point de rupture de la chaîne pourront s'accumuler : les analyses permettront, alors, de les identifier et de noter, s'il y a lieu, les modifications éventuelles de la nature chimique de ces composants. Nous avons donc mis au point une série de microtechniques permettant d'identifier et de doser, à partir de quelques mg de feuilles fraîches : les pigments chlorophylliens et caroténoïdes, les principaux cofacteurs du type plastoquinones et dérivés, les amino-acides libres (dont certains sont assez rapidement issus de la photosynthèse et d'autres participent à l'élaboration des pigments) et les sucres libres (d'origine essentiellement photosynthétique). Au cours de nos propres recherches, les résultats d'analyse de ces divers composés seront constamment présentés dans l'ordre qui vient d'être indiqué ci-dessus.

Nous allons maintenant rappeler les principales données bibliographiques qui jalonnent les étapes successives de notre travail.

A - CONDITIONS D'ANALYSE BIOCHIMIQUE DES MUTANTS CHLOROPHYLLIENS

Certains facteurs peuvent affecter l'expression biochimique des mutations chlorophylliennes : nous avons retenu principalement l'action de la lumière, celle de la température et l'influence de la feuille cotylédonaire.

a) Influence de l'éclairement

KOSKI et SMITH, 1951 (136) puis WALLACE et SCHWARTIG, 1954 (237) ont obtenu respectivement des mutants de Maïs et de Tournesol ne pouvant former de chlorophylle en lumière forte, mais seulement en lumière atténuée. De semblables observations ont été relevées par LEFORT, DURANTON, GALMICHE et ROUX, 1958 (153) sur des mutants de tomate "Xantha", et par REDEI, 1967 (188) chez l'Arabidopsis. D'autre part, l'hypothèse de WARBURG (239) attribuant un rôle déterminant à la lumière atténuée pour provoquer la formation de cofacteurs phosphorylés donneurs d'ATP s'est trouvée en conformité avec les travaux de KHAU VAN KIEN (131) qui, dans ces conditions, a trouvé l'existence d'une synthèse et d'une accumulation de plusieurs "quinones phosphorylées" correspondant aux plastoquinones A B C D (130), ainsi que la présence de formes cyclisées dérivées, du type chroménol-phosphate, pouvant jouer un rôle soit de précurseur, soit de formes de réserve. Compte tenu de la portée physiologique de ces phénomènes, il a donc paru très important de connaître les réactions des mutants après atténuation de lumière.

b) Influence de la température

Généralement, les lésions chlorophylliennes observées chez les mutants sont accentuées à basse température : de telles observations ont été rapportées dès 1954 par HOLM (111) chez l'Orge, puis par LANGRIDGE, 1955 (143) sur des mutants d'Arabidopsis. De même, NYBOM, 1955 (179) a signalé un mutant d'Orge "Viridis" à 21° C vibrant au type "Xantha" en culture à 12° C. Enfin, NISHIYAMA et MOTOYOSHI, 1966 (178) ont étudié un mutant d'Avoine "Albina" contenant plus de chlorophylles à température élevée. Inversement, chez l'Arabidopsis, REDEI, 1963 (190) a décrit un mutant contenant dix fois plus de pigments à 20° C qu'à 25° C, et, LANGRIDGE, 1965 (146) a montré que les exigences vitaminiques de certains mutants n'apparaissent qu'à température élevée.

c) Rôle de la feuille cotylédonnaire

Les rôles respectifs des diverses feuilles de la plante ont été relativement peu étudiés. Cependant, une synthèse des principales recherches effectuées dans ce domaine a été réalisée, par SESTAK et CATSKY, 1967 (209). Ainsi, NISHIDA, 1962 et DIE, 1963 ont montré des différences existant entre les feuilles jeunes et vieilles : les jeunes fabriquent des amino-acides, (alanine surtout) des lipides et des protéines, alors que les vieilles forment des sucres qu'elles exportent vers les lieux de synthèse. Cependant, selon WEBB et GORHAM, 1964 et JOY, 1964, les vieilles feuilles insérées vers le bas exporteraient surtout vers les racines. Enfin, DOODSON et al., 1964 ont conclu que l'intensité des échanges métaboliques dépend surtout de l'importance des besoins des organes accéteurs. Il apparaît ainsi que la feuille cotylédonnaire, qui, au départ, bénéficie largement des réserves de la graine, pourrait exercer sur les feuilles suivantes une influence défavorable à la mise en évidence des modifications biochimiques, d'où l'utilité d'examiner les conséquences de son ablation.

B - RECHERCHE DE CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES PARTICULIERES DES MUTANTS

Diverses méthodes permettent de mettre en évidence, chez les mutants, certaines propriétés biochimiques qui ne peuvent apparaître dans les conditions précédentes d'analyses.

a) Pouvoir de Reverdissement après étiolement

Les phénomènes d'étiolement obscur se traduisent, chez les végétaux, par une régression du système pigmentaire photosynthétique (DURANTON, 1966 (60), LANG, 1969 (142), POPOV et al., 1969 (186)) souvent accompagnée de diverses modifications du métabolisme protéique (SIGNORET, 1970 (213), WALKER 1970 (238), BOURQUE, 1971 (23)). Inversement, nous avons voulu éprouver l'aptitude du système pigmentaire des mutants à remonter vers le niveau initial de différenciation après passage par une phase d'étiolement plus ou moins accentuée.

b) Cinétiques d'incorporation de molécules marquées

L'utilisation de traceurs radio-actifs permet d'approfondir l'étude du métabolisme des mutants : ainsi, SANE et ZALIK, 1968 (198) et 1970 (199) ont étudié, chez des mutants d'Orge le métabolisme de l'acétate-2-¹⁴C, du glycolcolle-2-¹⁴C et de la leucine-¹⁴C (u) au niveau des chlorophylles, des sucres et des acides organiques totaux.

L'Acétate constitue, par la voie de l'acétyl-coA (SHAH et al., 1969 (210)) une plaque tournante du métabolisme s'ouvrant à la fois sur les glucides, les amino-acides, les lipides, les caroténoïdes, les acides organiques et les pigments photosynthétiques. Parmi les travaux déjà réalisés dans ce domaine, ceux de JOLCHINE, 1962 (119) ont montré que l'acétate-2-¹⁴C administré à des chloroplastes de Bryophyllum s'incorpore dans les lipides et les caroténoïdes, les acides organiques et certains amino-acides (acides glutamique, aspartique et γ -amino-butyrique, sérine et glycocolle). Selon l'auteur, la lumière faciliterait l'incorporation du ¹⁴C dans les caroténoïdes et n'aurait que peu d'effet dans les autres cas. Par ailleurs, SIRONVAL et MICHEL-WOLWERTZ, 1962 (216b) ont montré l'incorporation d'acétate-1-¹⁴C dans les chlorophylles de chlorelles et l'importance de l'éclairement pour intensifier le phénomène. L'acétate-1-¹⁴C se retrouve également dans les glucides (RIBEREAU-GAYON, 1966 (191)), ainsi que les acides gras entrant dans la constitution des lamelles chloroplastiques (TREMOLIERES, 1971 (231)). Nous avons donc choisi de suivre son incorporation au niveau des pigments, sucres et amino-acides chez les mutants et les plants normaux.

c) Etudes biochimiques au niveau des chloroplastes et du cytoplasme

Il est capital, pour l'étude de l'appareil photosynthétique, de vérifier au niveau des chloroplastes isolés les résultats obtenus sur les cellules entières. La Biochimie du chloroplaste isolé fait l'objet de recherches depuis relativement peu de temps, au niveau des structures métaboliques (VAN WYCK, 1967 (250)), THOMAS et BARTELS, 1966 (229), des acides nucléiques (MATSUDA et al., 1970 (163)) et de diverses enzymes (ANDERSON, 1970 (3)(4)). De plus, sur le plan radio-génétique, GIBOR et GRANICK ont démontré dès 1962 (80) le rôle spécifique des fractions extra-nucléaires dans le déterminisme des mutations chlorophylliennes. Nous avons donc complété nos travaux au niveau des éléments cellulaires isolés, par des méthodes biochimiques et histochimiques.

d) Utilisation d'inhibiteurs spécifiques du Métabolisme

Des enseignements très intéressants peuvent être tirés de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines réactions métaboliques, principalement lorsque leurs effets se traduisent par un phénotype de mutant chlorophyllien : il s'agit alors de "phénocopies chimiques". C'est ainsi que les travaux de SCHOPFER et GROB, 1952 (204), NIKOLAEVA et al., 1967 (176) et 1969 (177), LINNANE et STEWART 1967 (156), KULAEVA et al. 1968 (138) et BERRY et SMITH, 1970 (17) ont montré que des inhibiteurs de la synthèse protéique ont une action sur l'équipement pigmentaire photosynthétique. DOLPHIN, 1970 a même pu induire une accumulation de diverses formes de carotènes grâce à un traitement des plantes à la streptomycine. CARMELL et AVRON, 1969 (40) ont montré que des agents découplants ont une action sur l'ATPase chloroplastique, l'ATP jouant un rôle vis à vis de la Ribulose di-Phosphate carboxylase (CHAMPIGNY et BISMUTH, 1970 (41)). Ces éléments nous ont incité à analyser les répercussions sur l'appareil photosynthétique des plants témoins de quelques inhibiteurs de la glycolyse, de la synthèse d'ARN, de la synthèse d'ATP (agents découplants) et de celle du glycocolle (précurseur des chlorophylles) pour les comparer aux modifications biochimiques découlant des mutations. Enfin, nous avons examiné chez les plants témoins et mutants les effets biochimiques d'une inhibition de la photophosphorylation

...

à l'aide du p. Chloro Mercuri Benzoate à faible dose, selon les données de IZAWA et GOOD, 1969 (114).

C - RECHERCHES SUR LA REGULATION DU FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE

a) Intervention des amino-acides

La bibliographie concernant l'étude biochimique des mutants chlorophylliens a montré que, dans certains cas, des amino-acides tels que la leucine (62)(124), l'acide aspartique (62) ou la cystéine (190) peuvent être indispensables à la restauration du fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Inversement, la cystine et l'homocystéine jouent un rôle inhibiteur chez les mutants de REDEI (190) rendus viables par la cystéine, ce qui doit mettre en jeu, selon l'auteur, des mécanismes d'activation enzymatique et de rétro-inhibition qui n'ont pas été approfondis. Enfin, chez les plantes normales, les amines pourraient, selon GOOD, 1960 (186) activer la réaction de HILL et les travaux de JONES et CHEN, 1970 (121) montrent que la fixation de CO₂ par les algues vertes peut être stimulée par les amino-acides.

b) Intervention de l'activité phosphatasique alcaline

Divers travaux donnent à penser que l'activité phosphatasique alcaline pourrait jouer un rôle au niveau de la photosynthèse (HATCH et SLACK, 1968 (99 b et c), WELLS et HAGEMAN, 1970 (242), GLEW et HEATH, 1971 (82) et de la photophosphorylation (WESSELS, 1959)(244). Cependant, les mécanismes de régulation de cette activité enzymatique, que certains auteurs attribuent, d'ailleurs, à un même complexe enzymatique agissant sur différents substrats avec des cinétiques particulières (48)(60), sont encore mal connus. Nous savons, d'après les recherches de GAREN et ECHOLS, 1962 (77) que les ions Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Ca⁺⁺ sont activateurs, tandis que Be⁺⁺, les cyanures et les sulfures sont inhibiteurs et que les ions phosphates peuvent jouer un rôle répresseur. De plus, KUO et BLUMENTHAL, 1962 (139) ont montré que la présence d'un groupement aminé situé près de la liaison phosphate du substrat inhibe l'activité phosphatasique. Mais ce sont les récents travaux de Cox et al., 1967 (48) montrant que la phényl alanine, le tryptophane et la cystéine peuvent inhiber certaines phosphatases alcalines de mammifères, qui nous ont induit à penser que, chez les végétaux, c'est par intermédiaire de l'activité phosphatasique alcaline que des amino-acides pourraient agir sur l'appareil photosynthétique.

Nous verrons comment les résultats d'analyse biochimique des plantes normales et mutées nous ont progressivement amené à considérer plus particulièrement l'intervention de la leucine dans ce processus.

MATERIEL ET TECHNIQUES

- MATERIEL VEGETAL

- TECHNIQUES

- I - Techniques de cultures
- II - Techniques biochimiques
- III - Techniques radiochimiques
- IV - Techniques histochimiques
- V - Techniques biométriques

-.--.-.-.-.-.-.-.-.-

MATERIEL VEGETAL

Trois types de végétaux ont été utilisés au cours de ce travail :

- Arabidopsis thaliana (L) Heynh., une Dicotylédone de la famille des Crucifères dont les graines, de la race Estland, nous ont été fournies par J. LANGRIDGE (CSIRO, Canberra, Australie).
- Hordeum vulgare, variété pirolina (Monocotylédone, Graminées)
- Tradescantia, variété commune à feuilles vertes unies et fleurs blanches (Dicotylédone, Comélinacées)

Arabidopsis est une plante de petite taille pouvant être cultivée jusqu'à maturité en tubes à essais, dans des conditions aseptiques. De plus, lorsqu'elle est cultivée en jours longs, son cycle végétatif peut devenir très bref (moins de 20 jours pour certaines races) (93). Ces qualités permettent son utilisation pour les travaux de génétique biochimique, en particulier. Cette plante est, actuellement, très largement utilisée comme matériel d'étude (Arabidopsis Information Service)(*)).

Hordeum a été très utilisé en mutagénèse et de nombreuses variétés de Mutants chlorophylliens ont été produites (111)(118). Les plantules peuvent être cultivées aseptiquement en tubes jusqu'au stade 2ème et 3ème feuilles, vers l'âge de un mois.

Tradescantia a constitué, pour nous, une source permanente de cellules à chloroplastes. Ses propriétés biochimiques se sont avérées intermédiaires entre celles de l'Orge et de l'Arabidopsis.

-.--.-.-.-.-.-.-.-.-

(*) Ed. par Prof. Dr. G. Röbbelen, Gottingen

TECHNIQUES

I - TECHNIQUES DE CULTURES

a) Cellules de cultures aseptiques

Nous avons cultivé les plants d'Arabidopsis et d'Orge aseptiquement, dans des tubes individuels ou dans des pots, sur support de sable et liquide nutritif minéral "minimum" destiné à obliger les plantes à développer le maximum de leurs potentialités de biosynthèse.

Les tubes de verre "pyrex", sont composés de deux parties emboîtées (fig. 1-a). La première, de 2 cm de diamètre et 4 cm de hauteur, contient le sable ; elle est bouchée au fond par un tampon de laine de verre ; un second tube, plus large (2,5 cm) et de 30 cm de hauteur, recouvre le premier ; son extrémité supérieure est bouchée par un tampon de coton cardé.

Les cellules de cultures ainsi constituées sont disposées par groupes de 12 dans des portoirs dont les alvéoles communicantes permettent un remplissage collectif par inhibition (fig. 1-a).

Dans le cas où les plantes doivent subir des traitements physiologiques individuels précis, les cultures sont effectuées dans des tubes à essais ordinaires de 30 cm. Dans le même but, les alvéoles des portoirs peuvent être obturées et chaque tube est alors garni séparément.

Les pots destinés à la culture de plusieurs plants en même temps, sont constitués à partir de boîtes de Pétri en verre "pyrex".

Le sable est contenu dans un double fond en plastique percé, reposant sur le couvercle de la boîte de Pétri, placé à l'envers. Ce double fond est, lui-même, recouvert par le fond initial en "pyrex" (fig. 1-b). Cette disposition permet un apport facile de liquide par l'extérieur.

Lorsque les plantes grandissent, l'enceinte est rehaussée au moyen de tubes de verre ou de plastique translucide, de diamètre convenable.

Les sables utilisés pour les cultures d'Orge et d'Arabidopsis ne sont pas de même grain et les volumes de solution nutritive sont également adaptés à la taille des plantes et à leur nombre. Les principaux paramètres sont indiqués dans le tableau (1).

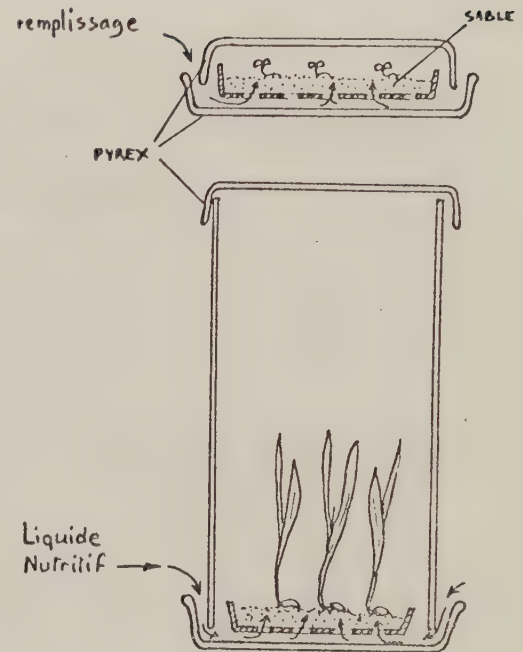
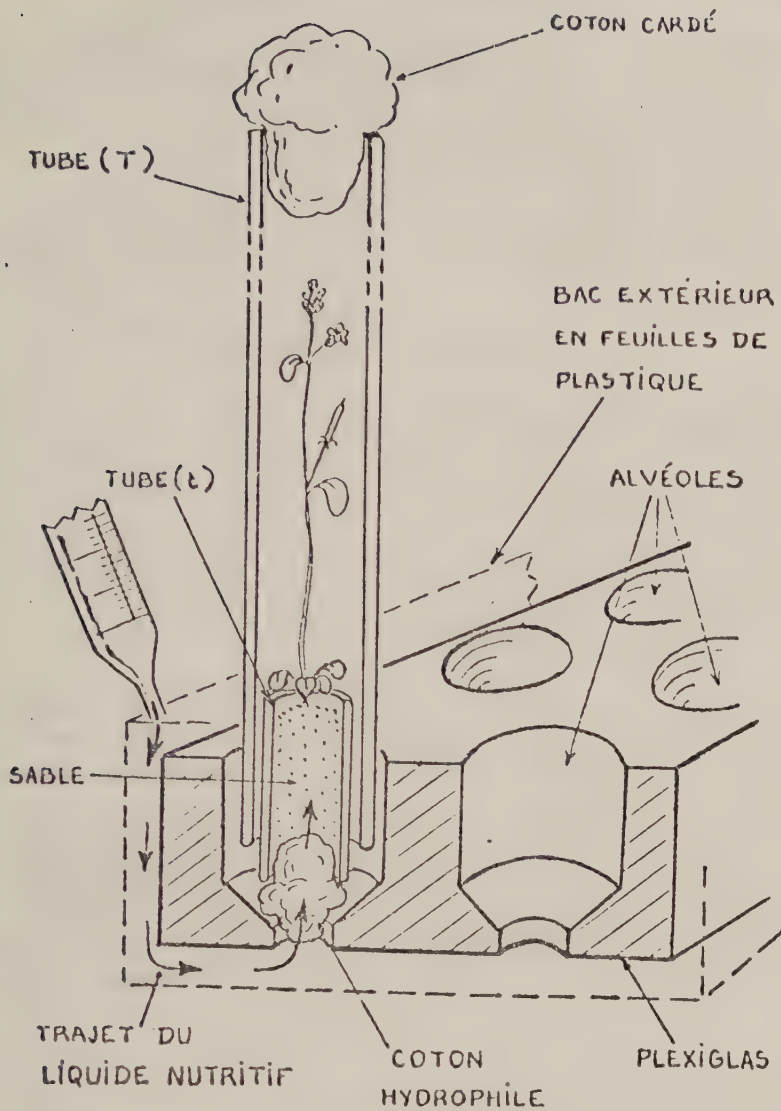


Fig. 1-a - Schéma, vue en coupe, d'un tube composé en place dans son portoir

Fig. 1-b - Cultures en boîtes de Pétri modifiées

Les caractéristiques moyennes sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau (1) : Caractéristiques des sables utilisés pour l'Orge et l'Arabidopsis

Plantes	Tamis Afnor	Densité g/ml	Volume par tube	Volume de liquide
Arabidopsis	26	1,5	6 ± 1	$3 \pm 0,4$
Orge	34	1,6	11 ± 1	$5 \pm 0,5$

b) Milieu nutritif

La synthèse des divers milieux, parfois très différents, utilisés par les nombreux auteurs travaillant sur Arabidopsis (144)(168) (69) nous a conduit à adopter la formule suivante qui tient compte des besoins particuliers en fer de cette crucifère (LANGRIDGE, 1957 (144)).

Solution mère de Knop (145).....	30 ml (macro-éléments)
Solution mère de Heller (109).....	1 ml (micro-éléments)
Solution de Jacobson : Fer-EDTA....	4 ml (116) (complexe Fe-EDTA)
Eau tridistillée.....QSP	1 litre
pH final $\approx$ 6	

Les formules détaillées sont indiquées en appendice

c) Température et Photopériode

La culture aseptique d'Arabidopsis en conditions artificielles a été très bien étudiée par LANGRIDGE (1957). La température de 24 - 1°C, favorable à une bonne croissance a été adoptée dans la pièce de culture destinée à cette plante.

La Photopériode détermine la date de floraison. Nous avons choisi 19 H de jour sur 24, ce qui doit correspondre, d'après les données de GREGORY et HUSSEY (93) à une floraison au bout de 28 jours.

De nombreux auteurs travaillent en lumière continue, avec un cycle végétatif nettement plus court, mais, nous avons préféré laisser 5 H de nuit aux plantes, pour permettre l'établissement du cycle nycthémeral que suivent de nombreux facteurs métaboliques (pH intra-cellulaire, amidon, acides organiques du cycle de Krebs.. L'éclairement est de 2600 $\pm$ 400 lux, donnés par des tubes fluorescents à lumière blanche (blanc "super" - tubes 2,40 m, 105 W).

Les plants d'Orge ont été cultivés dans une pièce différente donnant une photopériode de 15 H de jour sur 24, à une température voisine de 20° C. L'éclairement est un peu plus faible dans ce cas (1500 à 2000 lux - tubes de 40 cm - lumière blanche). En l'absence de régulation précise à toutes les périodes de l'année, les conditions réalisées dans le cas de l'Orge seront précisées pour chaque série d'expériences.

d) Conditions d'aseptie

Tous les éléments solides (verre, sable, laine de verre, coton, portoirs) sont stérilisés à l'autoclave pendant 1h30 à 130° C sous 1,8 bar.

Le liquide nutritif, en raison de la fragilité du complexe Fer-EDTA est filtré à travers une membrane de porosité 0,45 μ .

Les graines issues de plantes non cultivées en conditions stériles sont aseptisées par immersion dans l'éthanol à 55 % pendant quelques instants puis rincées avec de l'eau stérile.

II - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

Nous décrirons successivement :

- A - Les Techniques d'extraction des diverses fractions
- B - Les Techniques d'analyse des pigments et cofacteurs
- C - Les Techniques d'analyse des sucres et amino-acides libres
- D - Des Techniques complémentaires (dosage des Phosphates)

A - EXTRACTIONS

Le métabolisme pouvant varier au cours de la journée, en particulier celui des chlorophylles (SIRONVAL, (1953, 1962)(216a)(216b)) toutes les extractions ont été effectuées systématiquement au milieu de la "journée" artificielle des plantes, soit à 13h30 $\pm$ 30 mn.

Les métabolites sont séparés en deux fractions principales :

- fraction lipo-soluble ou éthéro-soluble
- fraction hydro-soluble (hydro-alcoolique)

1° Technique de Broyage

Nous avons utilisé, pour les petits échantillons (cas général) des broyeurs de type Poter, dont les tubes ont été spécialement fabriqués au laboratoire, pour pouvoir être directement centrifugés et permettre une continuité dans les extractions successives en évitant les transvasements et les pertes qui en résultent, d'autant plus que les échantillons sont de faible poids (40 à 300 mg de poids frais). Cette technique s'est avérée extrêmement efficace et reproductible (à moins de 1%).

2° Fraction éthéro-soluble

Les pigments chlorophylliens et cofacteurs sont totalement extraits par l'éther éthylique (de 0 à - 5° C) à raison de quatre cm³ pour 250 g de poids frais.

Les fractions sont réunies, additionnées d'éther de pétrole, puis concentrées sous pression réduite jusqu'à ce qu'elles puissent être ajustées à un volume correspondant à 1 mg de poids frais pour 10 μ l d'éther. L'enrichissement en éther de pétrole est plus important après évaporation et contribue à protéger les pigments contre les oxydations pendant la conservation des extraits, alors que l'éther éthylique (meilleur extracteur) les favoriserait s'il restait présent en trop grande quantité.

Une trace d'eau se sépare au fond de l'extrait éthéré : elle est recueillie et mesurée à l'aide d'une microseringue, avant que soit ajusté le volume d'éther, et re-introduite dans le résidu délipidé. Nous avons, cependant, vérifié qu'aucune trace d'acides ou de sucres ne figurait dans ce résidu.

3° Fraction hydro-soluble

Les tissus délipidés sont ensuite épuisés à l'aide d'un mélange éthanol-eau-acide acétique (85-13-2 v/v) à raison de 4 fois 5 ml pour 250 mg de substance fraîche. Lors de la première extraction, les tissus sont maintenus dans le solvant pendant une nuit au réfrigérateur vers 7° C. Les fractions de surnageant réunies après chaque extraction et centrifugation, sont concentrées à sec, sous 20 mm Hg vers 30° C, puis reprises par un mélange d'eau et 10 % de propanol-1 à raison de 1 μ l/mg de poids frais. Cette solution est, ...

ensuite, soumise à chromatographie.

4° Extraits enzymatiques

Les extraits préparés en vue de dosages enzymatiques, sont obtenus de façon légèrement différente, mais toujours par la technique du micro-Poter.

Les tissus sont délipidés par broyage dans l'acétone (de 0 à - 5° C), à raison de 2 fois 5 ml pour 250 mg de poids frais, puis séchés rapidement sous pression réduite. Le culot (poudre blanche) est alors repris dans un tampon, soit HEPES (80), soit TRIS-HCl 0,2 M qui sert de solvant pour les phosphatases. L'extraction est effectuée en deux étapes. Le tampon est directement ajusté, au départ, au pH de fonctionnement de la réaction -(7,5). La rapidité de l'opération est un facteur de bon rendement en activité enzymatique.

La concentration utilisée a été de 20 mg de poids frais par ml pour Arabidopsis et de 200 mg par ml pour l'Orge.

Etude des Phosphatases alcalines

Nous avons utilisé pour le dosage des Phosphatases, la micro-méthode de BRETON et coll., 1967 (31) utilisant des cellules de 0,1 ml groupées par 10 sur des plaquettes en plastique. Elles sont garnies de substrat (para-Nitro-Phényl-Phosphate - pNPP) avant l'expérience et, le moment venu, l'extrait enzymatique est introduit à l'aide d'une pipette Pasteur. La micro-cuve est scellée aux deux extrémités à l'aide de rubans adhésifs et placée devant la fente du densitomètre (chromoscan) équipé d'un filtre à 400 nm. L'apparition de p. Nitro-Phénol est alors mesurée par enregistrement en continu de l'augmentation de Densité Optique.

L'intérieur de l'appareil a été maintenu, au cours de nos expériences, à $29 \pm 1^\circ$ C grâce à un jeu de ventilateurs-chauffants.

L'équipement enzymatique général des plantes normales et mutées a été étudié dans le cas d'Arabidopsis, grâce à la micro-méthode de BUISSIÈRE et coll. (1967)(38).

Cette technique, basée sur l'emploi de substrats chromogènes spécifiques d'origine synthétique utilise les micro-cuves déjà décrites. Elle est très voisine de celle appliquée aux insectes par PLANTEVIN, NARDON et LAVIOLETTE, 1967 (II Int. Coll. Invert. Tissue Cult. Villa Carlotta - 9-10 sept 1967 - 16 p.).

B - ANALYSE DES PIGMENTS ET COFACTEURS ETHERO-SOLUBLES

. Micro-chromatographies

Nous avons établi un ensemble de techniques de micro-chromatographie quantitative en couche mince, utilisant, pour ces composés, des couches de gel de silice (K 301 v) et d'Alumine préfabriquées industriellement (Kodak)(24).

1° Les chlorophylles et caroténoïdes sont séparés sur couche d'alumine avec le solvant suivant :

Benzène : 55 ± 5 , Cyclohexane : 55 ± 5 , Acétone : $5,5 \pm 0,5$

Méthanol : 2,5

Les proportions exactes doivent être établies en fonction des propriétés particulières de chaque lot de plaques.

...

La fig. (2) montre un exemple de séparations :

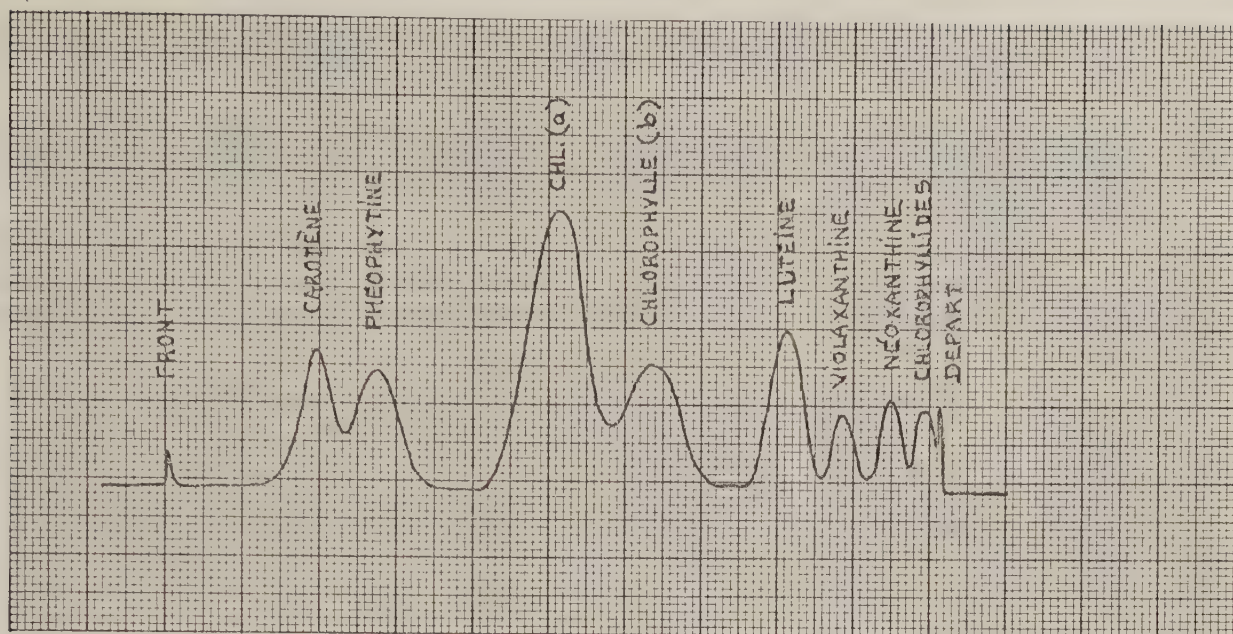


Fig. (2) - Chromatographie des pigments chlorophylliens sur couche d'alumine (G. N.)

Depuis la tache de départ où demeurent les chlorophyllides, nous trouvons successivement : Néo-Xanthine, Viola-xanthine, Lutéine, Chlorophylle (b), Chlorophylle (a), Phéophytines (b) et (a) et β -carotène.

Les chromatogrammes sont enregistrés à 400 nm (ou 440 pour les carotènes). Les courbes d'étalonnage donnent des résultats linéaires (en surface de pics) pour des valeurs allant jusqu'à 2,5 nM environ (Tableau 2).

La sensibilité des dosages est de 0,05 à 0,1 nM de chlorophylles (a) et (b).

Un spectre d'absorption peut être directement établi sur plaques par des mesures densitométriques successives de la même tache à diverses longueurs d'onde (BOUNIAS, 1969 (24)). Ces spectres sont comparables aux résultats classiques obtenus par spectrophotométrie en cuves, à un décalage près des longueurs d'onde, du fait du caractère polaire du support de silice ou d'alumine.

Le principal avantage de cette technique est de permettre d'établir rapidement le spectre de composés nouveaux apparus sur les chromatogrammes en quantités insuffisantes pour permettre l'élution et la spectrophotométrie en cuves.

2° Cofacteurs éthéro-solubles

Les vitamines et cofacteurs associés à la photosynthèse sont séparés sur couche de silice (K 301 v). Le solvant est un mélange d'éther éthylique et de cyclohexane dont la teneur en éther varie de 5 à 25 % selon le type de composé à séparer plus particulièrement. (BOUNIAS, 1969 (24)). (Avec le gel de silice, les taches sont plus nettes après une double migration dans le même solvant, de même que pour les amino-acides et les sucres sur couches K 511 v).

Pour nos expériences, nous avons effectué les séparations ainsi :

...

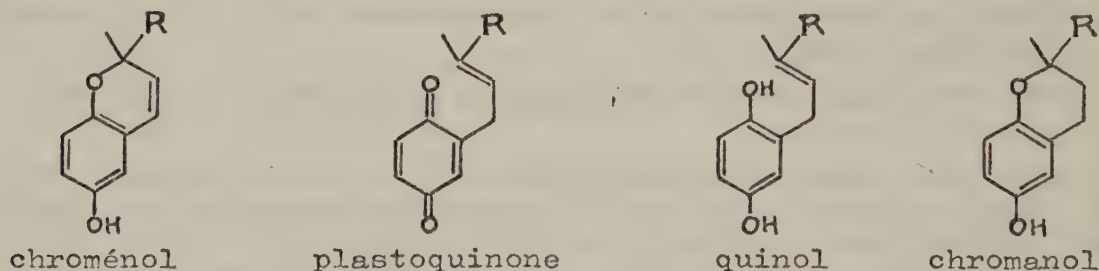
- 1) 2 migrations dans le solvant 5 % d'éther (distance environ 10 à 12 cm)
- 2) 1 ou 2 migrations avec 25 % d'éther (distance environ 5 à 7 cm)

L'activation préalable des plaques à l'étuve est à éviter car la dégradation des produits est d'autant plus grande que le support est moins hydraté.

Ces composés sont révélés par pulvérisation de pentachlorure d'antimoine à 20 % dans le tétrachlorure de carbone, puis chauffage quelques minutes à 80° C. Les enregistrements sont effectués, en général, à 465 et 540 nm.

Certains pigments et cofacteurs ont été séparés et purifiés en quantités plus importantes par chromatographie sur colonne d'alumine Merck, activée et hydratée de 7 à 12 % selon les cas, avec comme éluant de l'éther de pétrole pur, puis, progressivement enrichi en éther éthylique (de 1 à 10 %). Les plastoquinones A - B - C - D et leurs formes dérivées (C₁, C₂, D₁, D₂) ont été ainsi étudiées, ainsi que divers composés cyclisés du type chroménol. Ces techniques ont permis de parfaire l'identification des produits sur couche mince. Les plastoquinones phosphorylées ont été caractérisées sur plaques à partir d'étalons isolés par KHAU VAN KIEN, 1968 (130). La forme principale se révèle en bleu vif, avec SbCl₅.

Chez l'Orge et l'*Arabidopsis*, nous avons identifié diverses plastoquinones (de R_f décroissant de A et D), trois sortes de chroménols (dont l'un directement dérivé du tocophérol a été désigné par tocophéryl-chroménol ou toco-chroménol), dont les R_f sont inférieurs à celui du tocophérol, et deux formes de plasto-chroménols (dérivés de la pQA) dont les R_f encadrent celui du β carotène. Les noyaux chimiques de ces composés sont indiqués ci-dessous :



Les volumes déposés sur plaques vont de 0,2 à 5 μ l selon les cas et les réactifs sont pulvérisés à raison de 2 cm³ pour 100 cm² de plaque.

. Micro-méthode préparative pour l'étude des spectres en solution et des coefficients d'absorption spécifiques

De très petites quantités de pigments peuvent être obtenues très pures après une succession de micro-chromatographies préparatives réalisées en deux dimensions sur le même plaque, avec des découpages convenables de la couche mince.

Cette technique nous a permis de compléter l'étude de substances nouvelles apparues dans certains extraits et d'étalonner en valeurs absolues, grâce à la mesure de D. O., des solutions de caroténoïdes qui ont été utilisées pour calculer la relation entre surface de pics au densitomètre et quantité de produit présente sur la tache enregistrée.

Le tableau ci-dessous indique les principaux résultats

Tableau (2) - Absorption spécifique des pigments sur plaques chromatographiques à $\lambda 400$ nm, sans révélation

Composés	Chl.(a)	Chl.(b)	Carotène	Lutéine	Violaxanthine	NéoXanth.
$nM \times 10^{-3}$ / unité de surface de pic	2,28	2,39	1,84	1,86	2,01	1,615

Les cofacteurs de type plasto-chroménol et toco-chroménol n'étant pas encore bien connus, nous avons assimilé leur dosage à celui du tocophérol, de la vitamine K et de la p.Q.A. pour lesquelles nous disposions des étalons. Compte-tenu des modifications de structure, les coefficients adoptés ont été les suivants :

($nM \times 10^{-3}$ / u.i.) Tocophéryl-chroménol : 87 - Plasto-chroménol : 35
p.Q.A. : 21 (étalon pur)

C - ANALYSE DES SUCRES ET AMINO-ACIDES LIBRES

. Techniques de séparations et de mesures

Les sucres et amino-acides libres sont séparés sur couches de polycarbonate de diphenyl-propane (K 511 v) tamponnées à pH 6,8 par trempage dans du tampon phosphate 0,25 M frais, puis essorage entre des feuilles de papier filtre et séchage sous la hotte ventilée.

1° - Les Sucres libres

Les principaux solvants pour la séparation des sucres ont été décrits antérieurement (BOUNIAS, 1969 (24)).

Dans nos expériences, nous avons utilisé, généralement, une combinaison particulière de ces solvants appliqués successivement à la même plaque :

1) Butanol-1, Acide Acétique, Eau (75-15-15) :

1ère migration : 6 ± 1 cm

2ème migration : 12 ± 1 cm

2) Propanol-1, Acétate d'éthyle, Eau (70-20-10) :

1 migration : 17 ± 1 cm

Les séparations sont indiquées sur les enregistrements de la fig. (6), et les photographies fig. II (HT).

Les sucres sont révélés après pulvérisation d'anisaldéhyde sulfurique, puis chauffage 5 mn à 100°C. Le réactif est préparé en ajoutant, au moment de l'emploi, 0,8 ml d'anisaldéhyde à la solution-mère suivante :

La fig. (3) traduit l'excellente linéarité de la réponse, au moins jusqu'à 20 nM environ (3 à 4 μg).

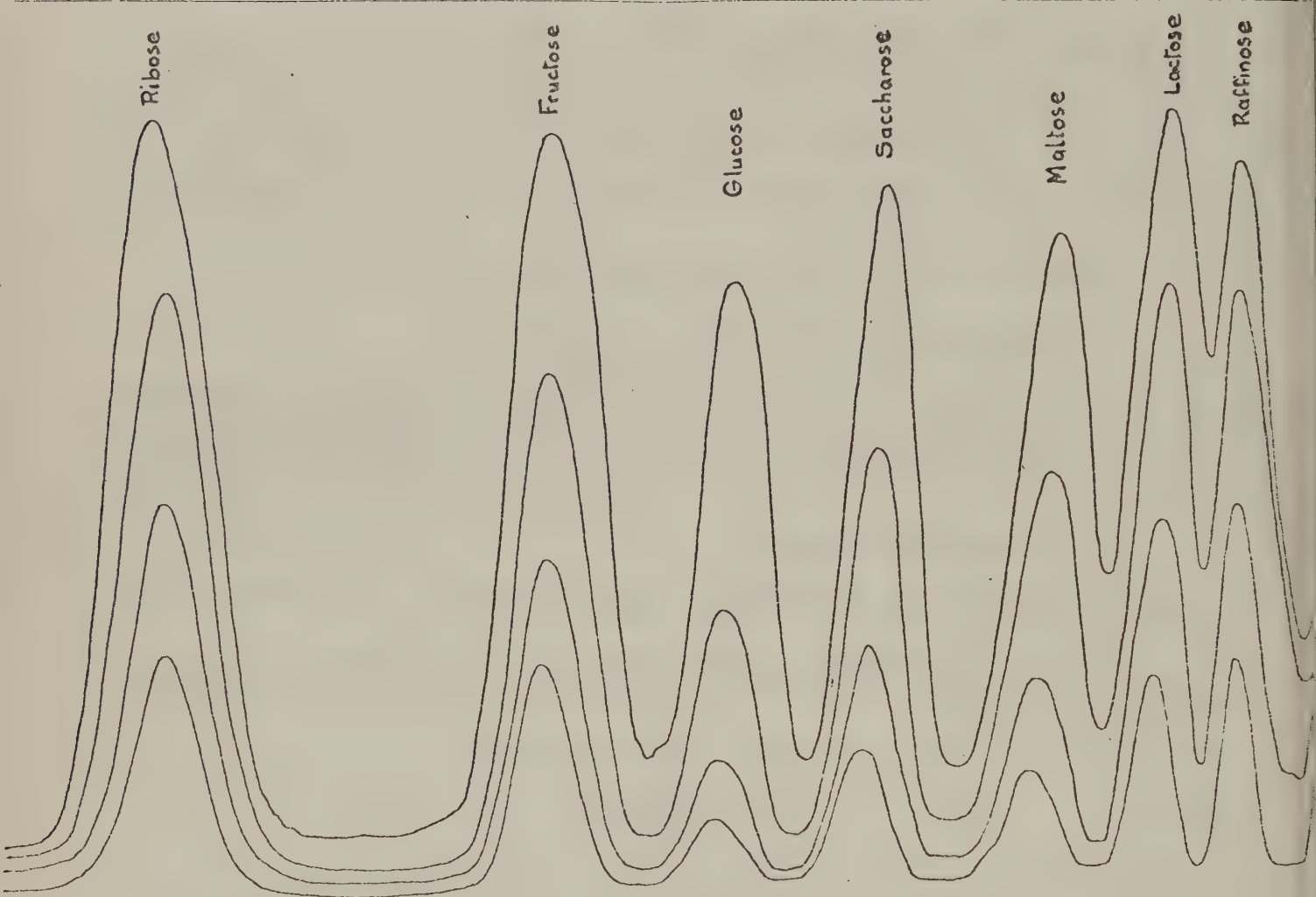


Fig. (3) - Enregistrements superposés de 4 chromatographies de sucres. Les quantités déposées sont les suivantes

0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,2 μg de Ribose

0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 μg pour les autres

Enregistrement à $\lambda = 620 \text{ nm}$

. Identification des sucres dans les extraits végétaux

a) Chez l'Orge

Une dizaine de taches ont été séparées chez l'Orge, dont 4 principales : Saccharose - Glucose - Fructose - Ribose. Seul le ribose a posé un problème d'identification, car, dans les solvants habituels, il migre au même endroit que le Xylose. Nous avons donc établi une technique particulière pour séparer ces deux produits : le solvant retenu est le suivant : n-Butanol, Méthanol, Eau (50-30-10) (2 migrations successives : 7 et 9 cm).

Les extraits d'Orge n'ont pas révélé la présence de Xylose en quantité décelable : la méthode générale précédente a donc été constamment utilisée par la suite.

b) Chez Arabidopsis

Les sucres d'Arabidopsis n'avaient pas été étudiés à notre connaissance ; or, comme les migrations sont souvent perturbées par la présence d'autres substances, nous avons utilisé plusieurs techniques différentes afin d'identifier au mieux les produits séparés :

- α) Superposition des taches étalons individuelles aux dépôts d'extraits de façon à réaliser les mêmes conditions de migrations pour les étalons que pour les produits naturels de l'extrait. L'étalon se superpose exactement à son homologue de l'extrait.
- β) Chromatographies bi-dimensionnelles : la combinaison des solvants suivants a permis d'excellentes séparations en 2 dimensions :
 - sens 1 : 1) n-Butanol-Ac. Acétique-eau (72-13-15) : 4 à 5 cm
 - 2) n-Propanol-Acétate d'éthyle-eau (70-20-10) : 8 à 9 cm
 - sens 2 : Iso-propanol-eau (85-15)-2 migrations successives de 5 et 9 cm respectivement.
- γ) Le spectre densitométrique des composés après révélation présente des caractéristiques propres aux divers sucres (planches hors texte)
- δ) Divers réactifs font apparaître des sucres différents : le phtalate d'aniline par exemple, élimine les sucres non réducteurs.

Ces divers arguments nous ont permis d'identifier le lactose, le maltose, le glucose et le fructose. Deux polyholosides (dont le raffinose) sont également séparés, de préférence avec le solvant : iso-propanol-eau (85-15) qui augmente les Rf des composés à faible migration. Le raffinose peut être distingué du mélibiose grâce au solvant : Ethanol-Eau-Pyridine (75-15-10) dans lequel ce dernier migre peu.

2°) Les Amino-acides libres

Les résultats de migrations avec quelques-uns des solvants étudiés sont indiqués dans le tableau suivant.

Tableau (3) - Exemples de Rf de quelques amino-acides naturels
(migrations sur couches de polycarbonate k 511 v)

Amino-acides et dérivés	Rf dans les solvants suivants			
	(1)	(2)	(3)	(4)
Ornithine	0,04	≈ 0	-	-
Lysine	0,078	0,01	0,053	0,067
Histidine	0,12	0,025	0,71	-
Cystéine	0,16	0,01	0,585	0,067
Arginine	0,15	0,025	0,117	0,085
Sérine	0,22	0,045	0,165	0,15
Glycocolle	0,26	0,055	0,185	0,175
Ac. Aspartique	0,27	0,03	0,106	0,14
Ac. Glutamique	0,43	0,06	0,285	0,25
Thréonine	0,48	0,10	0,565	0,31
Alanine	0,53	0,12	0,5	0,365
Proline	0,75	0,17	0,53	0,455
Valine	0,83	0,48	0,81	0,83
Méthionine	0,89	0,59	0,81	0,89
Tyrosineé	0,91	0,64	0,81	0,90
Iso-Leucine	0,92	0,75	0,81	0,94
Leucine	0,94	0,81	0,81	0,95
Phényl-Alanine	0,955	0,87	0,85	0,965
GABA	0,50	$\approx 0,20$	-	-
Ethanolamine	-	-	-	-
Tryptophane	0,97	0,95	0,83	0,975
Glutamine	0,28	0,05	-	0,20
Asparagine	0,47	0,06	-	0,14
Reproductibilité $\Delta Rf/Rf$	$\pm 1\%$	$\pm 2\%$	$\pm 5\%$	$\pm 2\%$

Solvants : (1) Phénol-Ethanol-Eau (22-44-34)
 (2) Butanol-1-Ac. Acétique-Eau (70-15-15)
 (3) Ethanol-Eau-NH₄OH concentrée (85-13-2)
 (4) Butanol-1-Ac. Acétique-Eau (65-20-15)

Pour nos expériences, nous avons utilisé la combinaison suivante de solvants, sur couche de polycarbonate (K 511 v) tamponnées à pH 6,8

1) Butanol-1, Ac. Acétique, eau : (80-15-15)

1ère migration : 16 ± 1 cm - séchage
2ème migration : 17 ± 1 cm - séchage

2) Ethanol - Eau - Pyridine (75-15-10)

1ère migration
2ème migration
3ème migration

Les séparations ainsi obtenues sont illustrées par l'enregistrement de la fig. (11) réalisé d'après la chromatographie d'une solution-étalon contenant 2 nM de chaque amino-acide, sur la tache de départ.

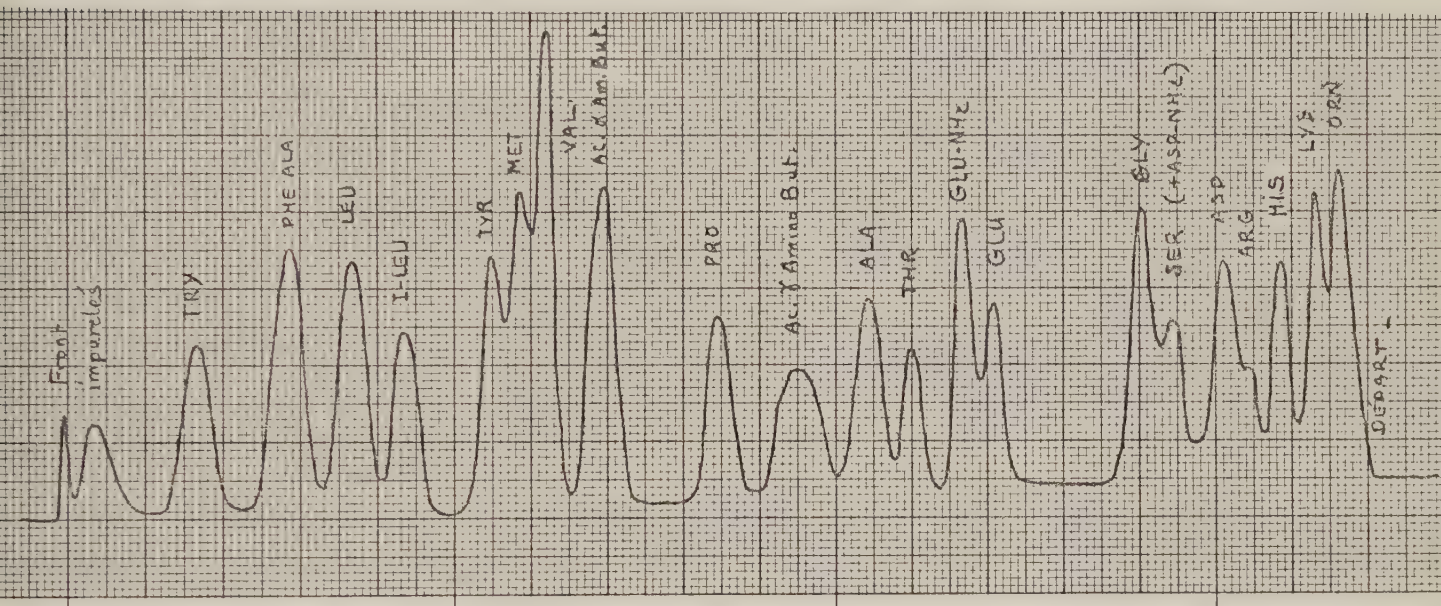


Fig. (4) - Enregistrement d'une chromatographie d'acides-amino. (λ 360 nm) - (Etalons, série L)

La Révélation des amino-acides est effectuée par pulvérisation de ninhydrine (147). Nous avons adopté la formule suivante qui permet, grâce à l'acétone, d'éviter la diffusion des taches (due au butanol et à l'eau) sans nuire à la sensibilité de la réaction (ce qui est le cas lorsqu'on supprime totalement le butanol). Cette révélation est un peu plus polychromatique que sans acétone et donne notamment une coloration bleue pour l'acide aspartique.

Ninhydrine (hydrate de tri-ceto-hydrindène).....	0,4 %
dans la solution mère suivante : butanol l.....	32
acétone.....	65
CH ₃ COOH pur...	3

La plaque est chauffée 2 à 3 mn à 100°C après pulvérisation. La réponse est quantitativement linéaire dans une zone comprise entre 0,2 et 4 nM environ. Nous avons vérifié la linéarité jusqu'à 10 nM pour la leucine qui sera utilisée à fortes concentrations dans certaines expériences.

Les amino-acides révélés présentent des spectres assez spécifiques, mais après quelques heures, les colorations tendent à s'uniformiser. Quelques spectres sont présentés hors texte. Les princi-

...

pales longueurs d'ondes couramment utilisées pour les dosages sont les suivantes :

λ 540 nm pour : LYS-HIS-ARG-ASP-SER-GLY-GLU-GLU.NH₂-THR-ALA-Ac. γ Am.
 λ 360 nm pour : Asp-NH₂, Proline, Ac. α Am. But., Bal., Met., Tyr.
 λ 465 nm pour : Val. I-leu. leu. Phe-Ala. Try. Ornithine.

Divers maxima d'absorption sont indiqués dans le tableau suivant, après réaction des amino-acides étalons avec la ninhydrine. Les spectres peuvent, cependant, varier quelque peu suivant les conditions de révélation.

Tableau (4) - Exemples de maxima d'absorption des amino-acides révélés avec la ninhydrine

Amino-acides	λ (n.m.)	Amino-acides	λ (n.m.)
L. Ornithine	430 à 465	L. Thréonine	540
L. Lysine	540	L. Alanine	540-565
L. Histidine	430-465-540	L. Proline	360
L. Arginine	360-430-520 à 540	Ac. Am. Butyrique	540
Ac. L. Aspartique	540-565	Ac. Am. Butyrique	360 à 400
L. Asparagine	360	L. Valine	360-465
L. Sérine	520-540	L. Méthionine	360-465
L. Glycocolle	540	L. Tyrosine	360-465
Ac. L. Glutamique	360-540	L. Iso-leucine	360-465
L. Glutamine	540	L. Leucine	360-465
		L. Phényl-alanine	360-465
		L. Tryptoph.	360-430-

La figure I Hors texte présente un exemple de chromatographie révélée (expérience sur Tradescantia)

- Méthode particulière de dosage de deux amino-acides dont les taches se confondent

C'est le cas pour Sérine et Asparagine dont la séparation n'est obtenue qu'au détriment de celle de plusieurs autres amino-acides. Le dosage reste cependant possible en utilisant les propriétés différentes d'absorption de ces deux composés après révélation : les longueurs d'onde aux maxima sont respectivement :

540 nm pour la Sérine
360 nm pour l'Asparagine.

Si l'on désigne par :

- K_S^{540} le coefficient d'absorption de la Sérine à 540 nm
- K_S^{360} " " " 360 nm
- K_A^{540} " " de l'asparagine à 540 nm
- K_A^{360} " " " 360 nm
- R_S le rapport $\frac{K_S^{540}}{K_S^{360}}$, R_A le rapport : $\frac{K_A^{540}}{K_A^{360}}$ (en général $R_S \cdot R_A \approx 1$)
- Σ_{540} et Σ_{360} les surfaces du pic contenant le mélange à 540 et 360 nm
- R_A le rapport $\frac{\Sigma_{540}}{\Sigma_{360}}$

Les concentrations en Sérine et Asparagine sont données par les formules :

$$[\text{Sér.}] = \frac{\Sigma_{540}}{K_S^{540} \left(\frac{R_S - R_A}{R_S} \right)} - \frac{\Sigma_{360}}{K_S^{540} \left(\frac{R_S - R_A}{R_S \cdot R_A} \right)}$$

$$[\text{ASp-NH}_2] = \frac{\Sigma_{360}}{K_A^{540} \left(\frac{R_S - R_A}{R_S \cdot R_A} \right)} - \frac{\Sigma_{540}}{K_A^{540} \left(\frac{R_S - R_A}{R_A} \right)}$$

D'autre part, le rapport $\frac{[\text{Sér.}]}{[\text{ASp-NH}_2]}$ est fonction du rapport R_λ

selon l'équation :
$$\frac{[\text{Sér.}]}{[\text{ASp-NH}_2]} = \frac{K_A^{360}}{K_S^{360}} \cdot \frac{(R_\lambda - R_A)}{(R_S - R_\lambda)}$$

L'emploi de substances étalons permet de constater que le rapport R_λ théorique et le rapport réel ne suivent pas toujours exactement la même variation car la somme résultante des deux densités optiques superposées peut être légèrement inférieure aux valeurs séparées additionnées. La superposition des deux étalons, sur le chromatogramme, juxtaposée aux étalons séparés permet de calculer une valeur effective de R_λ et de réaliser une légère correction des résultats obtenus par les équations. Cette correction dépend surtout de la révélation (chauffage) et de la fraîcheur du réactif.

Le glycocolle ne gêne pas ce dosage car, d'une part, il est présent dans les extraits en quantité faible par rapport à la somme Sér. + ASp-NH₂ (fig. 7) et d'autre part, sa séparation peut être améliorée par le prolongement des migrations dans le solvant à base de pyridine. Dans tous les cas, la forme de son pic peut être différenciée grâce à des méthodes classiques (167)(227).

Cette façon de procéder est applicable à d'autres substance présentant également des différences très nettes d'absorption densitométrique.

. Technique complémentaire pour autoradiographie

Dans le cas de mesures radiochimiques par autoradiographie, il a été nécessaire de séparer la sérine de l'asparagine : cette opération a été réalisée selon une modification de la technique habituelle de chromatographie, appliquées à des plaques supplémentaires réservées à cet effet. Les solvants utilisés sont les suivants :

- 1°) Butanol-1, Acide Acétique, eau : mêmes migrations que précédemment
- 2°) Ethanol-eau-NH₄OH Conc. (85-13-1) : 1ère migration : 6 ± 1 cm
2ème migration : 10 ± 1 cm

Ce dernier solvant remplace l'éthanol-eau-pyridine. Il permet une migration plus forte des amides, d'où leur séparation, à condition de ne pas prolonger la hauteur de migration indiquée. Dans ce cas, la thréonine, l'alanine, l'ac. γ Am. But., sont ramassés en une seule tache. De plus, NH₄OH perturbé considérablement la révélation, malgré les séchages soigneux. Cette modification est donc plutôt réservée aux autoradiographies.

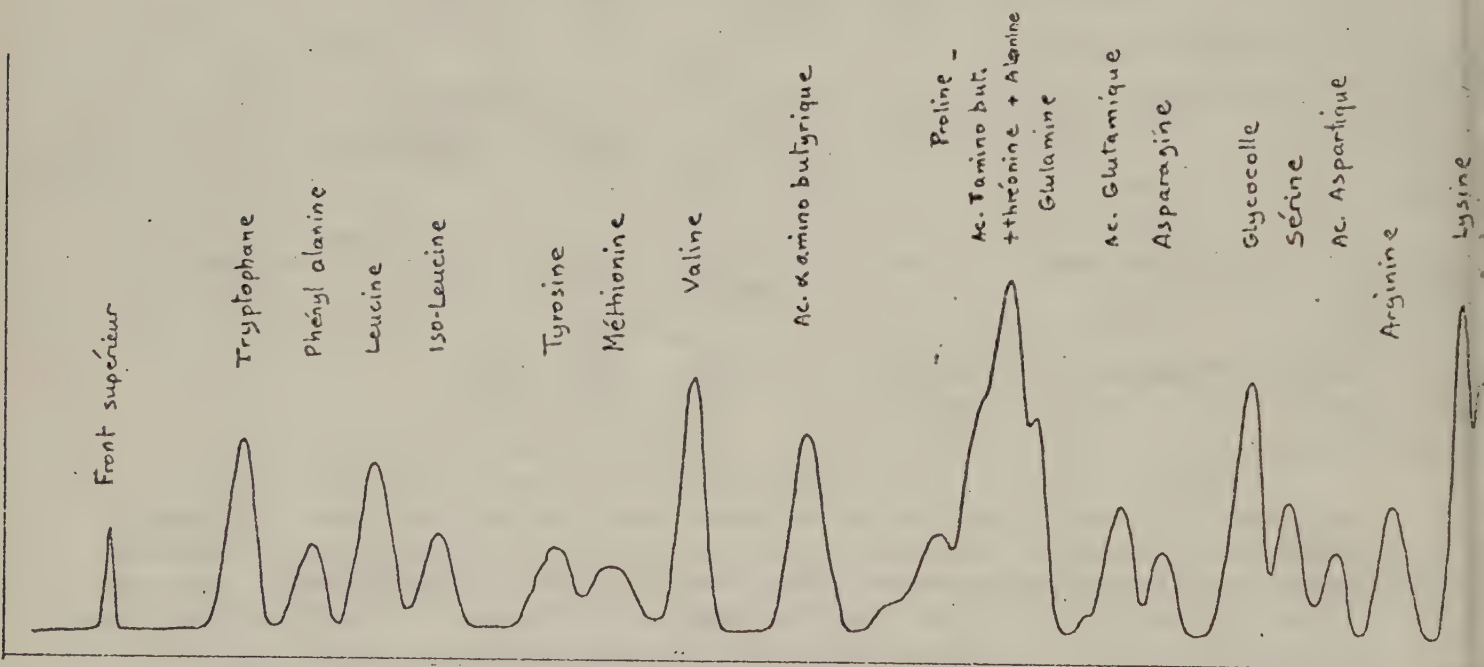


Fig. (5) - Enregistrement d'une chromatographie après migration avec le solvant à base d'ammoniac.

3°) Dosage des phosphates

Le phosphate minéral libre des extraits aqueux, le phosphate organique hyposoluble extractible avec l'acide Trichloracétique et le phosphate organique éthérosoluble de la phase lipidique sont dosés suivant la méthode MARINI 1965 (162), après minéralisation des esters en tubes scellés par l'acide sulfurique, à chaud. Le dosage est basé sur la formation d'un complexe par action de molybdate de sodium sur les ions orthophosphoriques. Ce complexe phosphomolybdique, réduit par le sulfate d'hydrazine, présente une coloration bleue (830 nm) qui est fonction de sa concentration en P_2O_5 .

III - TECHNIQUES RADIOCHIMIQUES

L'étude de l'incorporation de substances marquées au ^{14}C dans le métabolisme des plantes normales et mutées, a nécessité la mise en oeuvre d'une microméthode quantitative très sensible : l'autoradiographie.

La technique consiste à exposer un film radiographique double face sans écran (Kodirex) au contact des chromatographies de substances marquées, soit avant révélation, soit après. Dans ce dernier cas, les chromatographies de sucres doivent être isolées de l'émulsion par un film de protection très fin (mylar), à cause des rejets d'anisaldéhyde-sulfurique.

Après développement, au bout de durées convenables d'exposition, l'intensité des taches photographiques provenant de la radioactivité des produits est enregistrée au densitomètre par transmission à la longueur d'onde correspondant à la sensibilité maximum de l'appareil (ici : 420 nm environ).

La relation quantitative entre surface des taches et radioactivité a été déterminée d'après des gammes de leucine-(U)- ^{14}C d'activité croissante. La leucine utilisée a été chromatographiée, avant exposition, selon la méthode classique. Les taches étalons étaient en tous points comparables aux taches habituellement mesurées lors de l'étude d'extraits végétaux.

Les variations d'absorption, en unités d'intégration (mm^2), sont linéaires :

- 1) en fonction de l'activité spécifique pour un temps d'exposition donné (1 mois)
- 2) en fonction du temps d'exposition pour quelques activités données (en curies)

La relation générale de dosage est la suivante : coin optique n° 2)

- 1 mm^2 de surface de pic en 1 jour d'exposition correspond à

$$33,9.10^{-15}\text{Ci}$$

- 1 mm^2 de surface de pic en 1 mois d'exposition correspond à

$$1,13.10^{-15}\text{Ci}$$

L'utilisation d'un coin optique plus clair augmente d'environ quatre fois la sensibilité des mesures densitométriques (chromoscan).

Les dosages de sucres et d'amino-acides par voie chimique peuvent être réalisés à partir de la même solution. Cependant, par autoradiographie, les diverses classes chimiques doivent être séparées et purifiées : les amino-acides sont retenus sur résine ...

cationique forte puis élués avec NH_4OH (N), les acides organiques sont retenus sur résine anionique, puis élués avec HCOOH (N) et les sucres sont recueillis dans le résidu. Les conditions opératoires correspondant à 250 ou 300 mg de poids frais sont les suivantes : colonnes 5 mm x 24 cm avec :

2 à 2,5 g de résine amberlite I R C - 120 - Elution par 20 ml NH_4OH (N)

2 g de résine amberlite I R A - 400

Le rendement en amino-acides après passage sur la résine est le suivant :

Tableau (5) - Rendement après passage successif des Amino-Acides sur résines Anionique et Lationique

Amino-Acides	LYS.	HIS.	ARG.	VAL.	MET.	LEU.	Autres
Rendements %	81	79	83,5	73,5	50,5	98	100

Le rendement en sucres est plus variable. Il est souhaitable, dans ce cas, d'opérer très vite lors de fixations sur les colonnes et à froid, autant que possible.

Les figures suivantes montrent quelques exemples de résultats obtenus sur des extraits analysés d'Orge : la fig. (6) montre un enregistrement de sucres marqués après incorporation d'acétate- ^{14}C la fig. II HT montre côte à côte une chromatographie de sucres marqués après incorporation de leucine- ^{14}C avec l'autoradiographie correspondante, et la fig. (7) montre l'enregistrement d'une chromatographie d'acides aminés avec l'autoradiographie correspondante, dans le cas d'un marquage après introduction d'acétate- ^{14}C .



Fig. (6) - Enregistrement d'un autoradiogramme de sucres ^{14}C
 (exposition en 3 mois), provenant d'un mutant d'Orge
 (Marquage avec l'acétate- ^{14}C)

Densité optique de taches obtenues à partir de l'équi-
 valent de 2 mg de poids frais.



Fig. (7) - Enregistrements comparés d'une chromatographie d'acides aminés (Orge : V₃ avec acétate-¹⁴C temps 5H), et de l'autoradiographie correspondante

IV - TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES

Nous avons utilisé différentes techniques au cours de nos diverses expérimentations et observations : morphologie cellulaire, sucres, amino-acides, phosphatases et ATP^{ases} (résultats sur planches hors texte).

1) Etudes morphologiques

Les colorations des noyaux et de certains éléments cytoplasmiques (mitochondries, plastes), sont réalisées avec l'hématoxyline ferrique et l'hématéine-éosine, après fixation au Regaud ou du Helly post-chromés.

Les colorations du chondriome et des plastes sont réalisées avec la Fuchsine d'Altman (mitochondries rouges) et la Safranine (noyaux rouges, cytoplasme jaune), après les mêmes fixateurs que ci-dessus. L'érythrosine donne également des colorations cytoplasmiques rapides.

2) Etude des sucres

Nous avons mis au point trois types de colorations histochimiques dérivées des techniques biochimiques, à l'aide des réactifs suivants :

- Anisaldéhyde sulfurique : réaction avec les -OH en cis alternés ; révèle tous les sucres.
- Phtalate d'aniline : réactif de la fonction aldéhyde ou semi aldéhyde (sucres réducteurs).
- Urée chlorhydrique : réactif des cétooses et oligo saccharides.

La composition des réactifs est la même que pour les chromatographies mais avec dilution ; les lames sont imprégnées de réactif, recouvertes d'une lamelle ; elles sont introduites dans une chambre étanche (type boîte de Pétri) pour éviter l'évaporation du réactif et placées dans l'étuve vers 55° C, en présence d'un étalon-sucré déposé sur papier recouvert du réactif. Les durées de chauffage sont de l'ordre de 30 à 45 mn. Le montage doit être fait au sirop d'Apathy car le Xylène atténue les colorations.

L'amidon et les amylo et erythrodextrines peuvent être détectés de façon classique en violet-violacé par l'iode.

3) Etude des phosphatases et ATP^{ases}

Nous avons utilisé les techniques classiques de GOMORI pour les phosphatases et de WASHTEIN et MEISEL pour les ATP^{ases}. (*)

Pour les phosphatases alcalines, le substrat est du glycerophosphate de sodium qui libère le phosphate sous l'action des enzymes après 1 à 2 h d'incubation à 37° C. Le phosphate libéré est ensuite précipité par le calcium puis révélé au Cobalt ou au plomb. Ces derniers sont eux-mêmes mis en évidence par leurs sulfures (noirs).

Le principe de la méthode ATP^{asique} est très voisin, mais le substrat est alors l'ATP ($8.10^{-4}M$).

Les incubations sont effectuées en milieux tampons aux pH choisis et les préparations terminées sont montées au baume du Canada avec ou sans coloration de fond.

4) Etude des amino-acides

a) Localisations histochimiques globales

Nous avons adapté à la microscopie quelques techniques ...

biochimiques pour la détection des amino-acides dans le matériel végétal, en utilisant :

- la ninhydrine
- les sels de cuivre avec révélation secondaire par H_2S ou la laque d'hématoxyline
- le chlorhydrate de para-Nitro-Benzoyl

Ces réactifs ont été appliqués sur des préparations de fragments de feuilles avec cellules à chloroplastes, ou sur les chloroplastes eux-mêmes en empreintes et frottis. Pour améliorer la précision des localisations in situ, les solutions concentrées de réactifs ont été additionnées de substances anti-diffusantes telles que le blanosé, le sirop d'Apathy, la glycérine légèrement hydratée. Les réactions sont accélérées par un court chauffage des lames. Des localisations précises ont été obtenues, en outre, sur des chloroplastes isolés par voie sèche.

Les résultats des localisations par les trois réactifs se sont révélés identiques, dans les cellules étudiées.

b) Etude cytocristallographique des Amino-acides

Nous avons repris, avec KHAU VAN KIEN, une technique dérivée d'observations microchimiques anciennes (PLANTEFOL, 1923) basée sur la propriété qu'ont les amino-acides de cristalliser en milieu glycérociné ou déshydratant, de façon générale.

Les préparations de cellules et chloroplastes sont recouvertes de glycérine, et les microcristaux apparus présentent alors une morphologie caractéristique pour chaque amino-acide. Leur formation est favorisée par de légers chauffages et refroidissements successifs.

Cette méthode cristallographique nous a permis de mettre en évidence et de caractériser divers amino-acides cytoplasmiques et chloroplastiques par comparaison avec une gamme de produits-témoins cristallisés dans les mêmes conditions.

La réaction de cristallisation peut s'effectuer de façon concomitante en présence de glycérine et ninhydrine, par exemple. Les amino-acides suffisamment abondants sont caractérisés par les cristaux et ceux en plus faible quantité le sont par leur coloration.

Ces divers résultats sont illustrés sur les planches hors texte. Cette méthode nous a permis une approche de l'identification de certains amino-acides et surtout de leur localisation au niveau du chloroplaste, la caractérisation précise et les dosages ayant été effectués, par ailleurs, à partir de chloroplastes isolés.

c) Etude Autohistoradiographique des amino-acides

La localisation de la L. Leucine, obtenue de façon très caractéristique par cytocristallographie, a été contrôlée après incorporation de L. leucine-(U)- ^{14}C dans les feuilles d'Orge et d'Arabidopsis.

Les préparations, (coupes de feuilles, ou chloroplastes isolés par empreintes) sont recouvertes à l'obscurité d'émulsion autoradiographique (ILFORD G-5 ou L-4, couche de 25 μ fraîche et 6 μ sèche) et exposées pendant le temps nécessaire à l'impression, soit de 1 à 3 mois pour les doses de radioactivité employées : 150 à 200 $\mu Ci/mm$.

V - TECHNIQUES BIOMETRIQUES

1 - Méthodes d'analyse

Les méthodes de culture artificielle en tubes ont permis d'obtenir, en particulier chez Arabidopsis, des populations statistiquement très homogènes dont les paramètres de croissance se distribuent suivant la loi normale ; ainsi pour les hampes florales d'Arabidopsis, un échantillon de 42 plantes a été analysé après répartition en 9 classes ; la comparaison des distributions observées et calculées nous a donné un $\chi^2 = 0,283$ alors que χ^2 théorique = 5,99 au seuil 5 %, pour le degré de liberté $\nu = 2$, ce qui correspond à la probabilité $P = 0,90$. La hauteur moyenne du lot est : $\bar{H}_T = 177 \pm 10$ mm.

Les méthodes statistiques classiques (*) ont donc pu être appliquées de façon légitime. En résumé, les intervalles de confiance sont donnés par :

$$i = \pm \epsilon \cdot \alpha \cdot \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} \quad \text{pour les pourcentages}$$

$$i = \pm \epsilon \cdot \alpha \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad \text{pour les moyennes}$$

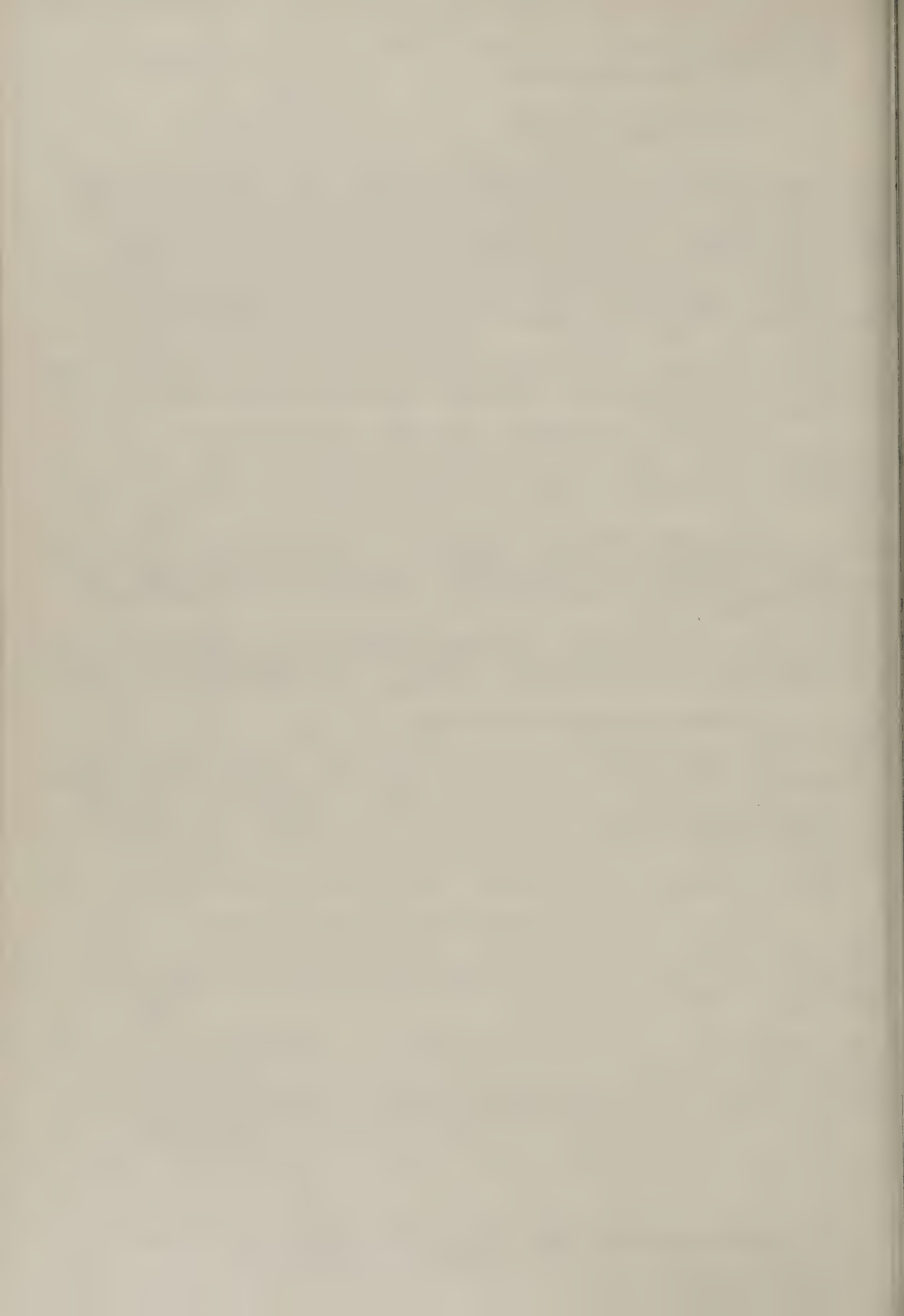
Les comparaisons de moyennes sont effectuées par le test t (petits échantillons). Les études de corrélation, régression, linéarité sont effectuées par analyse de variance (comparaison des variances dues aux divers facteurs intervenant dans le traitement) (test "F").

Dans les résultats mentionnés au cours de ce travail, nous n'avons rapporté les intervalles de confiance que dans les cas les plus défavorables afin de ne pas alourdir les tableaux de chiffres.

2 - Choix du matériel d'études

Le choix des plants à retenir à partir d'un lot pour les analyses constitue un problème délicat. Nous avons convenu de sélectionner le nombre de plants nécessaires en choisissant les individus dont les dimensions correspondent à la moyenne du lot pour chaque traitement.

(*) Daniel SCHWARTZ, 1966 ; Techniques statistiques à l'usage des médecins et biologistes.



PREMIERE PARTIE

ETUDE BIOCHIMIQUE DES PLANTES NORMALES ET MUTEES

- Chapitre I - Etude sur des rosettes de
feuilles d'Arabidopsis
thaliana normales et mutées
- Chapitre II - Etude sur des plantules
d'Orge normales et mutées
- Chapitre III - Etude de quelques mutations
chlorophylliennes plus
avancées, vers les types
"Xantha" et "Albina"

Cette partie a pour objet la définition des principales caractéristiques biochimiques des mutants chlorophylliens d'Orge et d'Arabidopsis utilisés au cours de nos recherches.

L'analyse des principaux constituants métaboliques retenus comme critères de comparaisons a été effectuée dans des conditions physiologiques de base définies permettant la mise en évidence des anomalies apparues chez les mutants et chez les plants Témoins comparativement.



CHAPITRE I

ETUDES SUR DES ROSETTES DE FEUILLES D'ARABIDOPSIS THALIANA NORMALES ET MUTEES

- A - Obtention des mutants
- B - Etude biochimique des Témoins au cours du développement
- C - Etude des mutants Viridis : 1° en lumière normale
2° en lumière atténuée
- D - Propriétés spectrales des pigments chlorophylliens et caroténoïdes isolés chez les plants normaux et "Viridis"

A - OBTENTION DES MUTANTS

Après une exploration des effets primaires des rayons γ du Cobalt-60 sur les graines sèches, de 0 à 500.10^3 rads, montrant une relation dose-effet discontinue de type particulier (jusqu'à $70-80.10^3$ rads, suggérant l'existence de phénomènes de régulation au niveau du méristème embryonnaire irradié (25), la recherche des mutants a été entreprise en 2ème et 3ème générations.

Les taux de mutations sont en forte corrélation négative avec le niveau de croissance après irradiation ($\rho = - 0,92$, $N = 12$) et la relation est statistiquement linéaire, confirmant les résultats obtenus par GICHNER (1966)(81) et BROCK (1967)(34). Parmi les diverses catégories de mutations, 70 % sont de type chlorophyllien, ce qui concorde également avec les données classiques (152).

L'un des mutants sélectionnés, de type "Viridis" viable, apparu avec un taux de disjonction de type $(1/4-3/4)$ (monofactoriel), s'est avéré stable pendant au moins 6 générations et paraît donc fixé à l'état homozygote. Il a fait l'objet d'une étude biochimique complète.

B - ETUDE BIOCHIMIQUE DES PLANTS NORMAUX AU COURS DU DEVELOPPEMENT (en lumière normale)

1° Paramètres de croissance

Les données proviennent d'une étude sur 250 plants cultivés selon nos conditions artificielles normalisées. L'évolution des stades physiologiques au cours du temps est indiquée sur les diagrammes de la fig. IV (HT). Le diagramme 1 donne les polygones de

fréquence correspondant aux pourcentages de germination et d'apparition des hampes florales.

Les diagrammes 2 à 5 indiquent le nombre de plants disponibles à un stade typique défini, non compris les plants de stades transitoires mal déterminés.

Les hampes florales, avec 19 H d'éclairement sur 24 H apparaissent sur les plants âgés de 17 ± 1 jours après germination et le premier épanouissement floral se produit au bout de 28 ± 2 jours conformément à ce qui était prévisible d'après les données de GREGORY et HUSSEY (93).

Les variations du poids frais moyen en fonction de l'âge (fig. V (HT)) montrent une augmentation assez nette jusqu'au stade 18 jours (apparition des hampes) puis le poids de la rosette se stabilise pendant quelques jours pour augmenter à nouveau après la floraison, mais avec une variance assez considérablement accrue. L'homogénéité des cultures est alors moins bonne. Le poids total de la plante ne subit, par contre, qu'un léger fléchissement.

Arabidopsis se présente donc comme un matériel très approprié aux études physiologiques, car elle permet de disposer rapidement de plantes à un stade bien défini en vue d'analyses biochimiques.

2° Evolution des teneurs pigmentaires

Les variations de teneurs en pigments chlorophylliens sont apportées dans le tableau I (HT) et illustrées par la fig. (10)

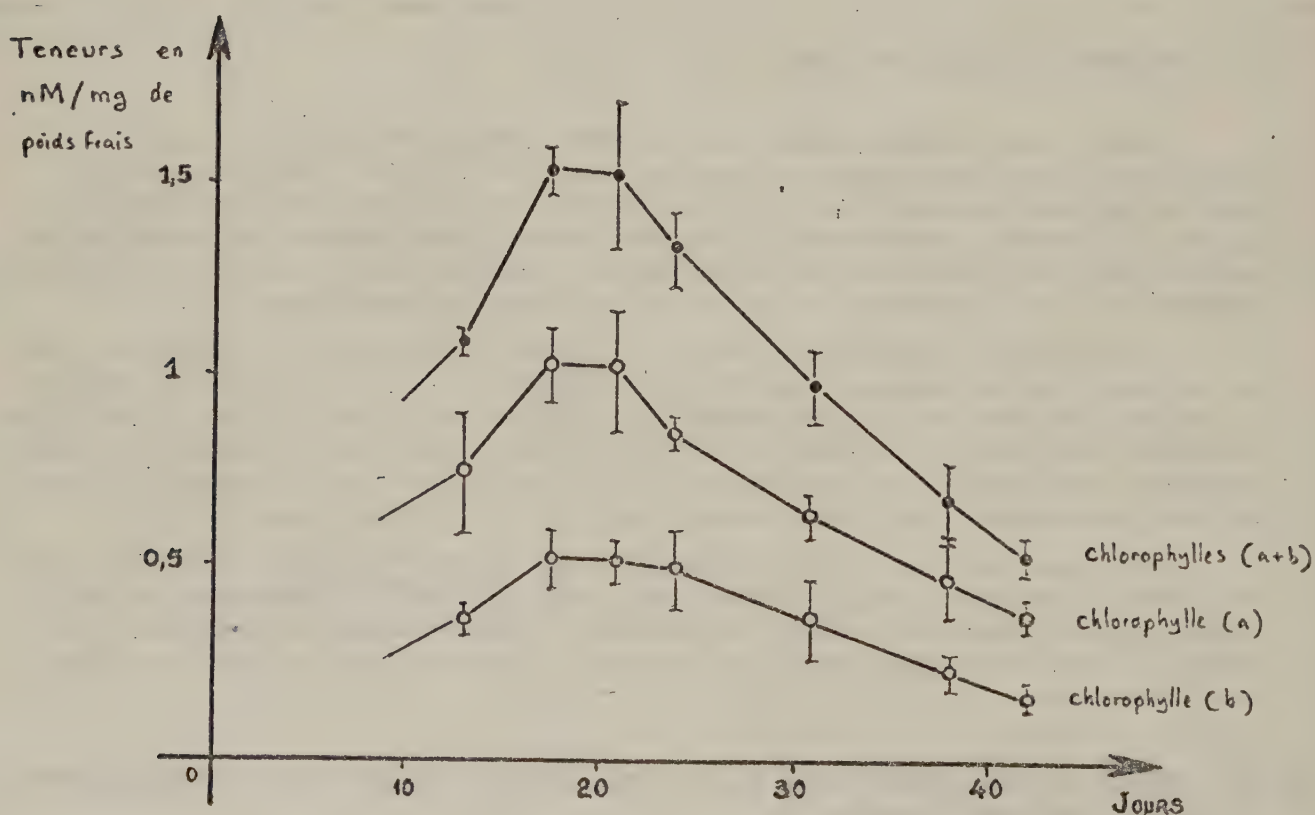


Fig. (10) - Evolution des teneurs en pigments chlorophylliens en fonction de l'âge dans les rosettes de feuilles d'Arabidopsis.

Les variations de teneurs en caroténoïdes sont indiqués dans le tableau II (HT) et illustrées par la fig. (11)

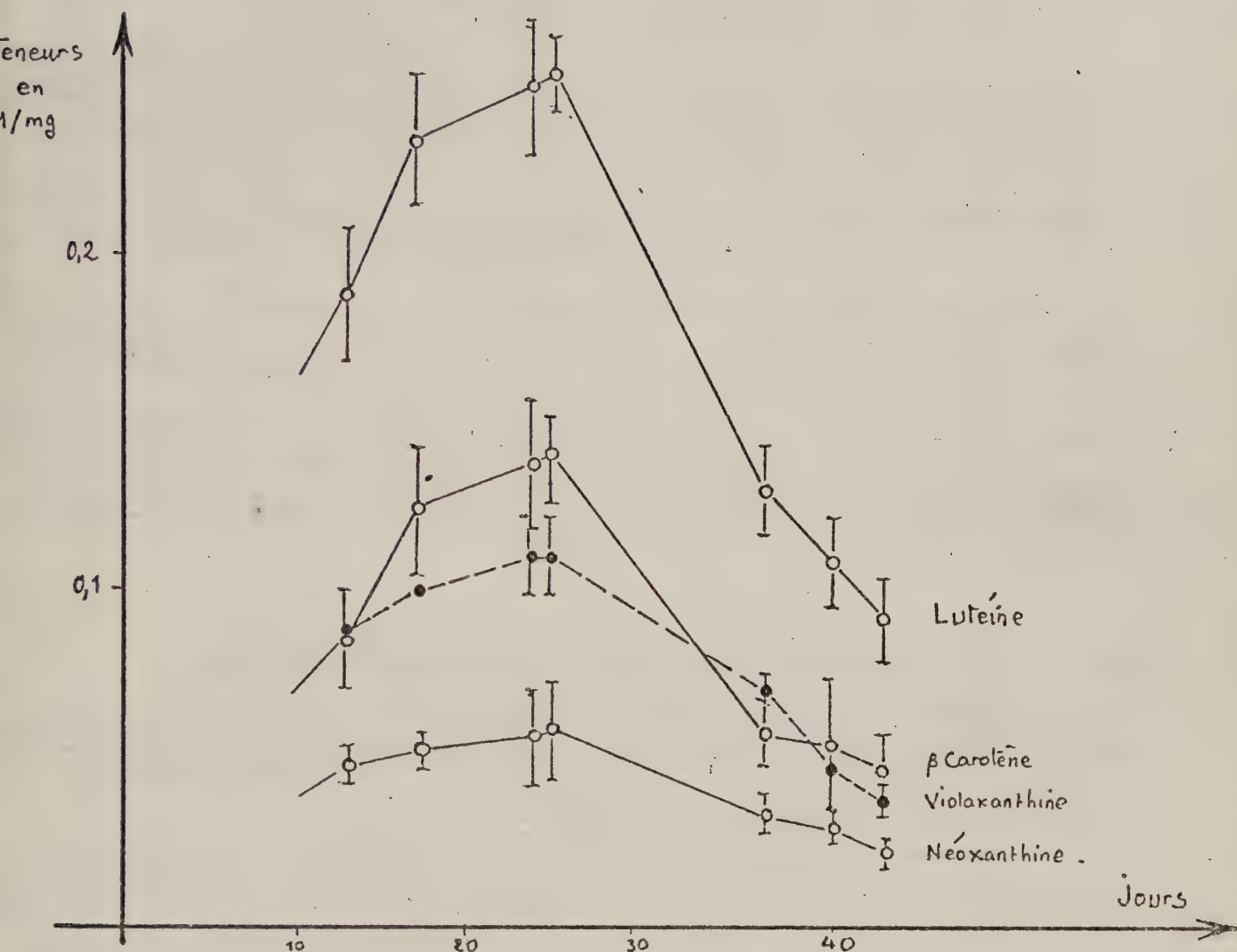


Fig. (11) - Evolution des teneurs en caroténoïdes en fonction de l'âge dans les rosettes de feuilles d'Arabidopsis

A la lumière de ces résultats, il apparaît que tous les pigments passent par un maximum : les chlorophylles aux stades 17 à 21 jours, soit au début de formation de la hampe florale, et les caroténoïdes aux stades 24-25 jours soit au voisinage du premier épanouissement floral. Le maximum pour la chlorophylle (a) est plus prononcé que pour la chlorophylle (b) et celui des caroténoïdes est de moins en moins accentués dans l'ordre des polarités décroissantes des produits. Au stade 24-25 jours correspond, en outre, la valeur la plus faible du rapport chl. (a)/chl. (b), soit 1,70 tandis que le rapport entre le β carotène et les formes oxydés (lutéine, violaxanthine, néoxanthine) atteint un maximum, soit 0,34.

...

Le maximum des chlorophylles correspond à une période d'intense activité physiologique. D'après de nombreux travaux (HOFFMAN et coll. 1965 (107), SESTAK, Z, 1963 (209)) il doit bien lui correspondre un maximum d'intensité photosynthétique, donc d'énergie disponible.

La phéophytine, peu abondante en général subit une brusque augmentation de teneur lorsque s'amorce la baisse des chlorophylles, ce qui correspond à la fois à la fin d'utilisation de précurseurs et à l'apparition accrue comme produit de dégradation.

Les recherches de HOFFMAN sur les vitamines K et plastoquinones laissent présumer une accumulation de ces produits en fonction du temps : ceci est confirmé par nos propres expériences, en particulier pour les plastoquinones (A) et (C) dont les variations sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau (6) - Variations de teneurs en plastoquinones (A) et (C) en fonction de l'âge (exprimées en nM/mg de poids frais)

Agés	13 jours	17 jours	25 jours
PQA	+	$0,0105 \pm 0,003$	$0,039 \pm 0,013$
PQC	$0,35.10^{-3} \pm 0,13.10^{-3}$	$0,35 \pm 0,13.10^{-3}$	$0,74 \pm 0,07.10^{-3}$

3° - Variation des teneurs en amino-acides libres

Les amino-acides d'Arabidopsis ont été peu étudiés : VELEMINSKY et coll. 1965 (234) et ŠVÁCHULOVA, 1967 (225) ont comparé les teneurs dans des cotylédons de mutants sur milieu nutritif minéral ou glucosé, mais leurs résultats sont encore fragmentaires, tant sur le plan qualitatif que quantitatif.

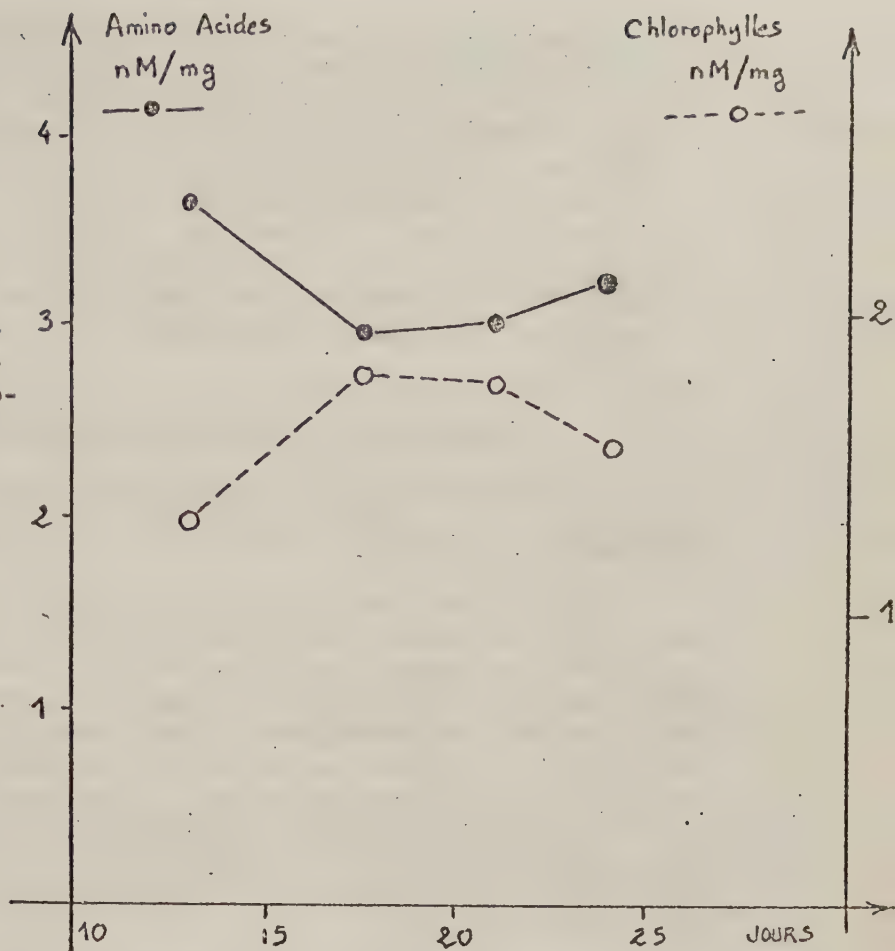
Les résultats de nos analyses sur les rosettes de feuilles aux stades situés avant, pendant et après l'apparition des hampes florales sont indiqués dans le tableau III (HT) et la figure (12). Les reproductibilités mentionnées par les écarts-types aux stades 13 jours et 17-18 jours correspondent à des lots de plantes cultivés et analysés à un ou deux ans d'intervalle, mais toujours dans les mêmes conditions, ce qui confirme la valeur des techniques de culture et d'analyse quant à l'homogénéité des résultats.

Arabidopsis contient donc essentiellement les principaux amino-acides naturels intervenant dans le métabolisme intermédiaire.

De nombreux amino-acides, et principalement : GLU, ASP, VAL, HIS, TYR, LEU, I-LEU, varient en fonction inverse des pigments chlorophylliens comme le montre le graphique ci-dessous (fig. 12)

Ces résultats confirment et précisent, au niveau des amino-acides individuels, les observations préliminaires de plusieurs auteurs (75) (118)(158) sur l'évolution des teneurs en azote aminé en fonction du développement des chloroplastes.

Fig. (12) - Evolution comparée au cours du développement des teneurs en chlorophylles et en quelques amino-acides représentés ici par la somme GLU + ASP + VAL + HIS + TYR + LEU + I-LEU



Cette relation entre pigments et amino-acides peut s'expliquer de plusieurs manières :

- a) Synthèse protéique : A la période d'intensité maximum de photosynthèse, les amino-acides, biosynthétisés en abondance, sont encore plus largement incorporés dans les protéines destinées à la construction de l'édifice floral, ce qui entraîne leur chute de concentration à l'état libre.

Ainsi, la méthionine, qui joue un rôle important dans la synthèse protéique présente, au cours du développement des plantes, des variations particulièrement intéressantes : sa teneur baisse de 25 % du stade 6 feuilles au stade hampes visibles, alors que le poids frais des plants passe de 6 à 9 mg (soit +30%); puis, la croissance marque un temps d'arrêt vers le stade 21 jours, et la teneur en méthionine remonte alors considérablement (+ 315 % par rapport au stade 18 jours) ; le poids frais des plants s'accroît à nouveau, ensuite, avec l'édification des hampes florales, et au stade 24 jours, la méthionine produite par les rosettes est certainement utilisée assez largement dans les protéines des hampes, puisque la teneur atteint sa valeur la plus basse.

- b) Relation avec les pigments : Les variations de certains amino-acides peuvent être plus directement reliées à la présence des pigments : c'est au moins le cas pour le glycolle, précurseur de l'acide δ -amino-lévéulinique qui entre dans la composition du

...

noyau porphyrinique des chlorophylles (et des protochlorophylles) et pour la leucine et l'iso-leucine qui peuvent participer à la formation de l'acide mévalonique, précurseur des caroténoïdes. Nous verrons, dans un prochain paragraphe, comment ce type de relation a pu être précisé par des contre-épreuves utilisant le principe d'un abaissement provoqué du taux de pigments.

- c) Exceptions : Les amino-acides du cycle de l'arginine (ornithine, proline) présentent des variations parallèles à celles des pigments ou parfois indépendantes : ce sera également le cas chez l'Orge.

4° - Variations des teneurs en sucres libres

Les quatre sucres principaux identifiés chez Arabidopsis subissent au cours du développement des variations que résume le tableau IV (HT).

Le glucose est très fortement utilisé, comme les amino-acides, lors de l'édification de la hampe florale, où il passe par un minimum très prononcé. Seul le polyholoside 1 (le plus élevé en Poids Moléculaire) subit le même type de variation, ce qui l'assimile à une réserve physiologique facilement disponible. Les autres sucres tendent à s'accumuler au cours du vieillissement : en ce qui concerne le fructose ceci pourrait être associé au fait que l'Arabidopsis en culture sur gélose + saccharose hydrolyse celui-ci, sans doute par une exo-enzyme et n'absorbe que le glucose, laissant le fructose dans le milieu. Le fructose semble être un cas particulier chez cette plante.

5° - Variations d'activité phosphatasique alcaline et de teneurs en phosphates libre et estérifié

L'un des troubles les plus importants dans la photosynthèse peut concerner la photophosphorylation, ce qui nous a conduit à examiner les paramètres suivants qui ont eu beaucoup d'importance dans l'étude des mutants.

a) Activité phosphatasique alcaline

Les meilleurs résultats ont été obtenus en présence de tampon HEPES (hydroxy-éthyl-pipérazine-sulfonate) décrit par GOOD, 1966 (85).

Le tableau suivant donne les variations de la vitesse initiale de réaction au cours du développement ainsi que les constantes de Michaelis apparentes vis à vis du para Nitro Phényl-Phosphate (pNPP). La concentration de l'extrait enzymatique correspond à 20 mg de tissus frais/ml. Les vitesses initiales sont données pour la concentration en substrat donnant la valeur maximum, soit :

$0,9.10^{-3}$ Moles de pNPP par litre

Tableau (7) - Variations d'activité phosphatasique alcaline chez les plants normaux au cours du développement.

Ages (jours)	12	16	17 - 18	31
Poids frais (mg)	4,7	12	12,2	24
V. initiale max. (10^{-3} M/l/H)	$1,32 \pm 0,029$	$1,37 \pm 0,050$	$1,70 \pm 0,23$	$2,03 \pm 0,50$
Km(M/l pNPP)	$5,15 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$	$5,5 \pm 2,2 \cdot 10^{-5}$	$4,7 \pm 0,8 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \pm 1,1 \cdot 10^{-5}$

Les valeurs de V_m et Km ont été calculées d'après la courbe de MICHAELIS-MENTEN (166) ainsi que la représentation de LINEWEAVER et BURK (155), en coordonnées inverses (fig. 14).

La constante Km ne varie pas significativement au cours du développement, mais la vitesse de réaction marque un point d'inflexion avec augmentation à partir du stade 17/18 jours : en première analyse, la concentration en enzyme paraît s'accroître au moment de la formation des hampes florales.

b) Teneurs en Phosphates libres et estérifiés

Les dosages sont effectués sur trois fractions : le phosphate libre, le phosphate estérifié de la fraction éthéré et celui de la fraction alcoolique-aqueuse. Les résultats figurent dans le tableau suivant :

Tableau (8) - Variations des teneurs en phosphates au cours du développement (teneurs exprimés en $\mu\text{g/g}$ de poids frais)

Ages (jours)	Poids moyen frais (mg)	Phosphate minéral libre	Phosphates organiques		Phosphate total
			hydrosoluble	éthérosoluble	
15	4,7	214	+	16	~ 240
20	11,2	232	22	58	312
24	14	149	25	67,8	242
29	32	87	29	53,4	203

A partir du début de croissance des hampes florales, le phosphate libre est fortement consommé et s'incorpore en particulier dans les fractions organiques, principalement dans la phase lipidique (phospholipides et pigments phosphorylés). Une certaine quan...

tité paraît perdue, peut-être exsudation.

La fraction organique hydrosoluble comprend principalement les esters phosphoriques de sucres, amino-acides, acides organiques, l'ATP et ses dérivés, tandis que la fraction éthérosoluble contient essentiellement les phospholipides et les dérivés phosphorylés de pigments et cofacteurs.

C - ETUDE DES MUTANTS VIRIDIS

1° - Etude en lumière normale

a) Morphologie comparée des Mutants et des Témoin

La germination des viridis est identique à celle des normaux, soit un taux de 98 % sur les plantules, les cotylédons sont de taille réduite avec $2,29 \pm 0,2$ mm d'envergure (N = 20) au lieu de $3,74 \pm 0,3$ mm chez les Témoin.

Le tableau suivant indique quelques repères à divers stades

N=20	Stade hampes visibles		Stade croissance terminée
	Ages	Poids	Hauteur moyenne des hampes
Témoin	19 jours	11 ± 1 mg	$170 \text{ mm} \pm 10 \text{ mm}$
Mutants	21 jours	7 ± 2 mg	$90 \text{ mm} \pm 15$

Les différences de taille sont significatives à tous les stades et le retard de croissance peut atteindre 3 jours. La figure 13 montre les cinétiques d'allongement des hampes.

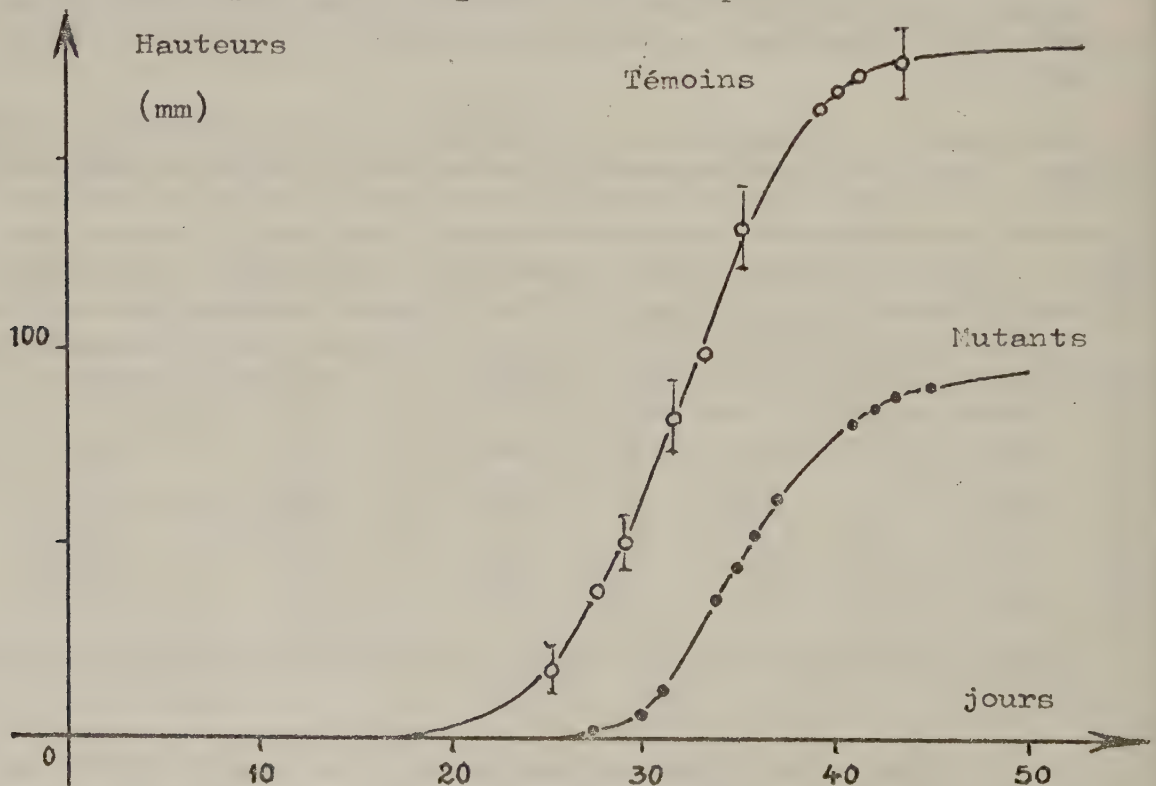


Fig. (13) - Comparaison de la croissance des hampes florales chez les Mutants et les Témoin d'Arabidopsis

b) Equipement enzymatique

Aucune différence n'a pu être appréciée dans l'équipement enzymatique, à ce niveau expérimental. Parmi les enzymes recherchées, les suivantes ont été décelées, dans l'ordre décroissant d'activités (notées de 0 à 5).

Phosphatases acides.....	4	DL-Alanyl-amino peptidase...	2
Phosphatases alcalines.....	3	Estérase nonanoïque.....	1
Estérase acétique.....	3	Estérase myristique.....	1
Estérase butyrique.....	2	Galactosidase.....	1
L-leucyl amino peptidase....	2	Glucosidase.....	1

c) Equipement en Pigments et Cofacteurs

Les comparaisons ont été effectuées au même stade physiologique, soit au moment de l'apparition des hampes et du maximum de photosynthèse.

Tableau (9) - Equipement pigmentaire des mutants viridis comparé à celui des normaux (en nM/mg de Poids frais)

ts	chlor. (a)	chlor. (b)	Carotène	Lutéine	Viola-X.	Néo-Xanth.
ins	1,09 ± 0,07	0,514±0,07	0,165±0,04	0,31 ±0,08	0,148±0,038	0,084±0,028
dis	0,53 ± 0,13	0,175±0,01	0,098±0,03	0,135±0,012	0,046±0,02	0,023±0,01
	48,7	34	59,4	43,4	31,3	27,7

Tous les composés voient leurs teneurs réduites chez les mutants. Cette diminution croît avec la polarité des composés, ce qui pourrait faire penser à une déficience dans le greffage des groupements hydroxylés.

Les cofacteurs éthéro-solubles ont été comparés également chez les mutants. Des résultats plus caractéristiques mettant en évidence une déficience métabolique spécifique ont été obtenus après action de la lumière atténuée sur les plantes et sont présentés dans un paragraphe suivant.

Tableau (10) - Comparaison des cofacteurs éthéro-solubles des mutants avec ceux des normaux (résultats en nM/mg de poids frais)

Plants	Tocophéryl chroménol	Chroménol-2	Chroménol-3	Plasto Chroménol - II
Témoins	3,87	1,42	0,84	2,11
Mutants	4,12	1,92	1,04	2,96
$\frac{M}{T} \%$	106	135	124	140

Contrairement aux pigments, les cofacteurs sont presque tous accumulés, surtout ceux dérivant de formes plastoquinoniques : seul le tocophéryl-chroménol demeure inchangé. Les mutants semblent donc présenter un ralentissement de l'utilisation de certains composés considérés comme des formes intermédiaires du transfert des liaisons phosphates vers les produits synthétisant l'ATP à partir de l'ADP, en particulier le plastoquinol-phosphorylé (KHAU VAN KIEP 1968)(131).

d) Sucres libres

Les résultats indiqués dans le tableau ci-dessous traduisent une diminution générale chez le mutant, excepté pour le maltose qui constitue peut-être une forme de réserve mal utilisée, comme chez les maïs "Xantha" décrits par EYSTER (1924)(65).

Tableau (11) - Teneurs comparées en sucres chez les mutants viridis et chez les normaux (nM/mg de poids frais) au stade d'apparition des hampes florales.

Plants	Lactose	Maltose	Glucose	Fructose
Témoins	0,243	0,15	0,556	0,37
Mutants	0,182	0,19	0,425	0,29
$\frac{M}{T} \%$	75	126,6	76,5	78,4

La photosynthèse conduit à la formation de glucose, d'où une proportionnalité prévisible entre les concentrations en sucres et celles en pigments. Dans cette hypothèse, il paraît alors surprenant de constater que la diminution de teneurs en sucres chez les mutants par rapport aux témoins est nettement inférieure à la réduction des taux pigmentaires : ceci donne à penser qu'il existe une "rétro-synthèse" des sucres plus active chez les mutants que chez les plants normaux, sans doute par la voie de l'acétyl-coenzyme A et de la glycolyse anaérobie prise en sens inverse. Cette observation sera confirmée ultérieurement par l'emploi de traceurs radioactifs.

e) Amino-acides libres

De nombreux amino-acides libres se trouvent plus concentrés chez les mutants que chez les témoins pris au même stade (apparition des hampes florales à 17 et 18 jours, respectivement). Les données numériques figurent dans le tableau V (HT).

...

Ce résultat peut s'expliquer par les relations entre chlorophylles et amino-acides déjà observées chez les plants normaux, et l'accroissement des teneurs en lysine, acide aspartique, asparagine, acide glutamique, glutamine, thréonine, alanine, méthionine, tyrosine et phényl-alanine correspond bien à la réduction des taux de pigments chez les mutants.

De même, l'arginine, la proline et le glycocolle, qui ne suivent pas la relation, à ce stade physiologique, n'augmentent pas chez les mutants.

Il ne reste donc que trois exceptions : la leucine, l'isoleucine et le tryptophane, dont les teneurs tendent à baisser alors qu'elles auraient dû augmenter pour suivre les variations en sens inverse de celles des pigments : or, le tryptophane est plus particulièrement relié à la synthèse d'hormones (acide indolyl- γ acétique) et de pigments non photosynthétiques (mélanines) et nous verrons que c'est le cas de la leucine qui s'avèrera particulièrement important dans le cadre de l'Appareil Photosynthétique.

f) Activité phosphatasique et teneurs en phosphates

. Les vitesses initiales de réaction et les valeurs de Km sont indiquées dans le tableau ci-dessous à différents stades de croissance, et sur la fig. (14)

Tableau (12) - Activité phosphatasique chez les mutants d'Arabidopsis

Stades (jours)	13 jours	17 18 jours	31 jours
Vitesse initiale max. (10^{-3} Moles/l/H pNPP)	1,69 $\pm$ 0,30	2,23 $\pm$ 0,25	2,63 $\pm$ 0,108
Km apparente (10^{-5} M. en pNPP)	4,35 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 2,8	5,8 $\pm$ 1,4

Comparés aux valeurs obtenues chez les plants normaux, les résultats permettent de conclure à une augmentation significative d'activité chez les mutants à tous les stades, sans différence significative de la valeur de Km. Ces paramètres peuvent être interprétés de deux façons possibles :

- soit augmentation de concentration en enzyme
- soit levée d'une inhibition de type non compétitif résultant d'un niveau de régulation chez les plants normaux.

Nous verrons dans les chapitres suivants que ces deux hypothèses sont, en fait, très proches l'une de l'autre.

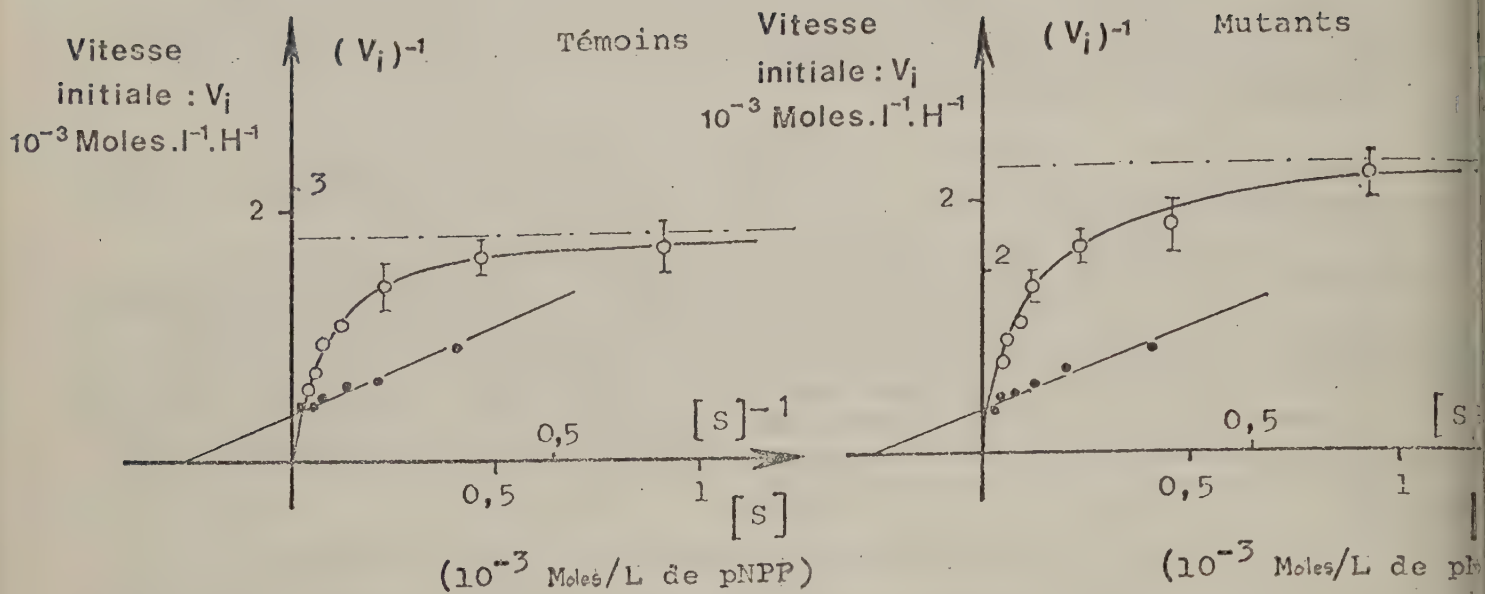


Fig. (14) - Activité phosphatasique au niveau des rosettes de feuilles d'*Arabidopsis* normales (1) et "*Viridis*" (2) au stade d'apparition des hampes florales :

{ Courbe de MICHAELIS —○—
 { Droite de LINEWEAVER et BURK —●—

. Les teneurs en phosphates : libres, organiques hydro-solubles et organiques éthéro-solubles ont été mesurées à 2 stades suivant la montée des hampes florales. Les résultats, consignés dans le tableau VI (HT), montrent une réaction dynamique de sens opposé à celle des témoins pour toutes les formes considérées, et aux stades correspondants (fig. (15)). Les teneurs totales en phosphates sont, d'autre part, bien supérieures chez les mutants.

Contrairement aux réactions des Témoins, la fraction des lipides phosphorylés s'accroît, de même que celle des formes libres, alors que les formes hydrosolubles chutent rapidement. Le phosphate libre étant inhibiteur des phosphatases par répression (GAREN et ECHOLS, 1962 (77)) seule la forme organique éthérosoluble pourrait contenir une ou plusieurs substances inductrices de cette activité enzymatique (à titre de substrat).

Dans ces conditions, la relation Phosphate-Phosphatases pourrait être également abordée sous l'angle inverse, à savoir que l'augmentation d'activité phosphatasique (due à une autre cause) s'est traduite par une hydrolyse des esters hydrosolubles. (-48 µg entre 24 et 33 j) entraînant une augmentation de teneur en forme libre (+ 76 µg). Là encore, nous constaterons, par la suite, dans les chapitres suivants que les deux hypothèses précédentes sont intimement liées dans le cadre d'un mécanisme général de régulation.

...

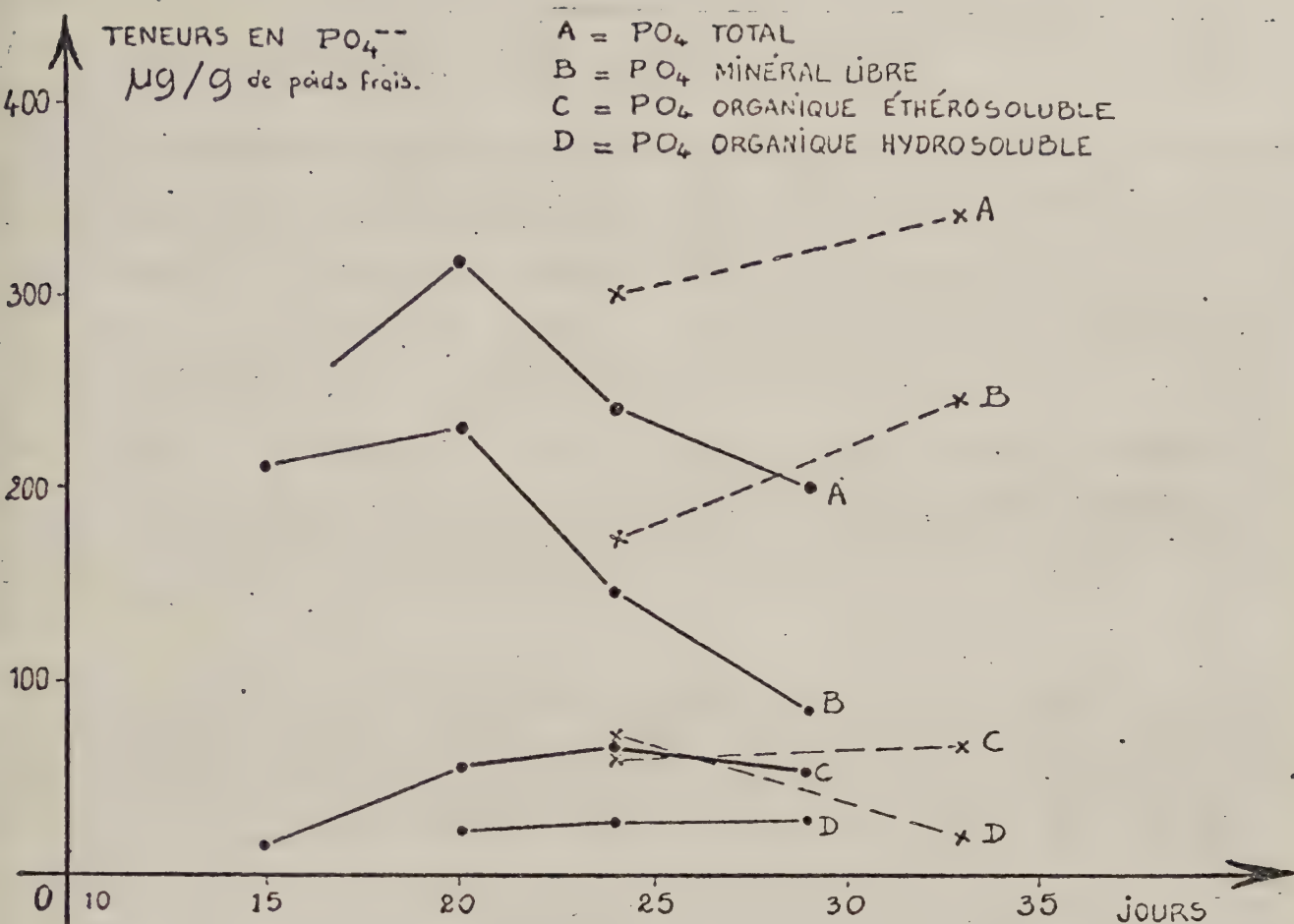


Fig. (15) - Evolution comparée des teneurs en phosphates chez les mutants et les témoins : $\left\{ \begin{array}{l} \text{---} \bullet \text{---} \text{ T} \\ \text{---} \times \text{---} \text{ M} \end{array} \right.$

2° Etudes en lumière atténuée

La bibliographie nous a montré l'intérêt qui présentent les expériences en lumière atténuée, tant pour l'étude des mutants (153) (136)(237) que pour celle des plants normaux (131)(238).

Nous avons donc analysé les réactions des plants normaux et mutés sous l'effet d'une atténuation de lumière de courte durée (5 H) et nous présenterons également l'influence de la prolongation du traitement chez les plants témoins. Les divers paramètres physiques correspondant à ces expériences sont présentés ci-dessous. La durée d'éclairement (19 H sur 24) et la température ($24,5 \pm 0,5^\circ C$) sont communes aux diverses expérimentations. Les photo-traitements sont appliqués exactement avant le moment des extractions.

...

Tableau (13) - Paramètres lumineux pour Arabidopsis

Durées d'atténuation	5 heures	24 heures
Lumière normale (T. et M.)	2600 $\pm$ 400 lux	1800 $\pm$ 300 lux
Lumière atténuée (T. et M.)	25 $\pm$ 10 lux	-
Lumière atténuée } (T. seuls) courte et prolongée	11 $\pm$ 1,5 lux	9,5 $\pm$ 0,6

L'expérimentation s'opère en deux étapes distinctes : au cours de la première, les plants normaux et mutés sont étudiés après 5 H d'exposition à 25 lux ; les chlorophylles et caroténoïdes sont déterminés par évaluation spectrophotométrique ; au cours de la 2ème phase, des plants normaux sont soumis respectivement 5 H à 11 lux et 17 H à 9,5 lux.

a) Variations des teneurs pigmentaires

. Etude des pigments chlorophylliens et caroténoïdes

Tableau (14) - 1ère phase - Etude des variations respectives des taux de pigments chez les plants normaux et mutés, après 5 H à 25 lux.

Pigments	Témoins (nM/mg)		Mutants (nM/mg)	
	L. N.	L. A.	L. N.	L. A.
Chlor. (a)	1,12	0,76	0,66	0,46
Chlor. (b)	0,44	0,258	0,18	0,12
Caroténoïdes (totaux)	0,58	0,435	0,33	0,28

L'atténuation de lumière rapproche l'équipement pigmentaire des témoins de celui des mutants cultivés en lumière normale : il s'agit donc d'une phénocopie obtenue par un moyen Physique. Les mutants traités subissent des variations de même sens et d'amplitudes voisines.

Tableau (15) - 2ème Phase - Variations après prolongement de l'atténuation de lumière chez les plants normaux (nM/mg)

Essais : traitements lumineux	Chlor.(a)	Chlor.(b)	Carotène	Lutéine	Viola-X.	Néo-Xanth.
11 lux/5 ^H	0,537	0,27	0,124	0,230	0,13	0,099
9,5 lux/24 ^H	0,59	0,37	0,131	0,28	0,16	0,114

Cette expérience, qui sera également répétée chez l'Orge, montre qu'au bout d'un certain temps la plante réagit au traitement et renforce son équipement pigmentaire, sans doute pour capter le plus d'énergie possible.

. Etude des Cofacteurs

Après un traitement de 5 H sous 25 lux, nous avons obtenu chez les mutants comme chez les témoins une formation accrue de "quinone-phosphate". Les divers composés ont été, d'une part, analysés sur couche mince et, d'autre part, séparés sur colonne d'alumine puis caractérisés au spectrophotomètre U.V. Les dérivés phosphorylés ont été purifiés selon les techniques de KHAU-VAN-KIEN (1964)(131), afin de parfaire leur identification. Les résultats sont résumés ci-dessous, sous forme du rapport : Teneur des mutants/Teneur des Témoins (%).

Tableau (16) - Etude comparée des cofacteurs chez les mutants par rapport aux Témoins après atténuation de lumière 5 H à 25 lux (1ère phase)

Composés : Formes	Tocophéryll quinone 1	Tocophéryll chroménol 1	Chroménol (-Phosph) 2 ou 3	Quinol Phosphate 1	Quinol Phosphate 2	Plasto Chroménol 1 2
M - % T	57 ± 7 %	38 ± 2 %	175 ± 2 %	59 ± 5 %	39 ± 5 %	70 ± 10 % 53 ± 5 %
Spectre : λ maxi(nm)		277-283	277-283			277-283

Une partie aliquote de ces composés réunis (produits phosphorylés seulement) a été utilisée pour un dosage du phosphate. Nous avons obtenu respectivement : 76 µg de P₂O₅ chez les mutants contre 21 µg chez les Témoins. Le seul dérivé concordant avec cette augmentation des teneurs est un facteur dont le spectre présente le double pic 277-283 nm, caractéristique des noyaux chroménols. Ce composé migre sur couche mince juste au-dessus du tocophéryll-chroménol. Nous l'avons assimilé en première analyse à la forme 2 habituelle.

...

Il s'agirait donc d'un chroménol-phosphate, toujours très abondant par rapport au quinol-phosphate.

Les quinols-phosphates de nos échantillons ont été mis en évidence sous 2 formes sur les 4 trouvées par KHAU-VAN-KIEN sur d'autres végétaux. La forme principale est dérivée de la plastoquinone B estérifiée avec l'acide palmitique identifiable par chromatographie en couche mince (KHAU-VAN-KIEN et BOUNIAS) et par spectrophotométrie au pic λ 238 nm (KHAU-VAN-KIEN).

Le plasto-chroménol de la forme 1 se situe sur couche mince entre la p.Q.A. et le carotène, alors que la forme 2, plus fréquente, migre au-dessus du carotène.

L'obtention du quinol-phosphate de l'*Arabidopsis* s'est avérée très délicate à contrôler : les paramètres physiques ainsi que les stades physiologiques interviennent de façon très précise. Il s'agit en effet de freiner la dégradation du produit par la lumière, sans en ralentir la synthèse. Le stade proche de l'apparition des hampes florales est le plus favorable et grâce au traitement par la lumière atténuée, nous avons pu isoler ces cofacteurs et les étudier.

Au cours des essais d'atténuation prolongée, nous avons simplement retrouvé les composés habituels, dont les teneurs sont données ci-dessous en nM/mg.

Tableau (17) - Influence de la lumière atténuée prolongée sur les cofacteurs

Echantillons	Tocophéryyl chroménol	Chroménol-2	Chroménol-3	Plasto-Chroménol-
T. N.	3,87	1,42	0,84	2,11
T. 11 lux/ 5 ^H	2,50	0,90	0,88	38,7
T. 9,5 lux/17 ^H	2,70	1,41	1,33	35,9

En lumière atténuée prolongée, le tocophéryyl-chroménol reste inférieur à la valeur normale tandis que l'une des formes voisines ainsi que le plasto-chroménol s'accumulent : ce phénomène doit être inversé chez les mutants, pour se traduire par une diminution relative de ces composés.

Les voies de transfert du phosphate sont très certainement perturbées chez le mutant : la forme de réserve (plasto-chroménol-phosphate) trouvée chez diverses plantes (chêne vert, épinard, platane) par KHAU-VAN-KIEN pourrait redonner la forme physiologique fonctionnelle (phosphorylée ou non).

L'étape phosphorylée de la chaîne de transfert semble donc partiellement inhibée chez les mutants. Il s'agit, d'ailleurs, d'un blocage incomplet, donc d'une mutation "à fuite".

L'accumulation des dérivés phosphorylés se traduit dans le bilan des phosphates organiques de la fraction éthérée comme le montre le tableau suivant :

Tableau (18) - Comparaison des teneurs en phosphates organiques liposolubles après atténuation de lumière chez les Mutants et Témoins (μg de P par g) (stade hampes visibles)

	Témoins	Mutants
Lumière normale	58	60
Lumière atténuée	36,2	131

En ralentissant la consommation de dérivés phosphorylés, l'atténuation de lumière a donc permis d'accentuer le trouble métabolique et de le déceler. Dans les conditions normales, les mutants se trouvent en état d'équilibre, mais avec une photosynthèse ralentie et une croissance réduite.

b) Etude des amino-acides libres en lumière atténuée

Les résultats de comparaison du métabolisme chez les témoins et les mutants après 5 H sous 25 lux sont consignés dans le tableau VII (HT) (stade hampes visibles, Age : 17/18 jours).

Pour interpréter ces résultats, nous avons juxtaposé, dans le tableau ci-après, les pourcentages respectifs des variations relatives en lumière atténuée par rapport à la lumière normale, chez les plants normaux et mutés, et les variations naturelles consécutives à l'évolution du taux de chlorophylles chez les Témoins.

Tableau (19) - Teneurs comparées en amino-acides libres chez les témoins et mutants d'Arabidopsis (L.N. et L.A.)

Amino-acides	$\frac{MA}{MN}$ % (moy.)	$\frac{TA}{TN}$ % (moy.)	$\frac{MN}{TN}$ % (moy.)	$\frac{T(13-24 \text{ j})}{T(17-18 \text{ j})}$ %
Lysine	175	233	236	138
Histidine	116	131	101	118
Arginine	200	131	66	33
Sérine	107	105	105	105
Glycocolle	79	54	60	62
Ac. Aspartique	178	215	176	157
Ac. Glutamique	117	125	112	125
Thréonine	158	103	135	160
Alanine	113	146	147	126
Proline	121	142	62	75
Valine	337	362	111	139
Méthionine	131	117	179	102
Tyrosine	350	285	137	146
Iso-leucine	445	410	91	140
Leucine	325	410	81	115
Phényl-ala.	360	169	125	113
Ala. + Sér. + Gly.	104	104	103	98

L'observation de ces chiffres confirme la relation de cause à effet entre les teneurs en pigments et celles en amino-acides libres : les phénocopies que constituent les plants normaux placés en lumière atténuée réagissent qualitativement et presque quantitativement comme chez les mutants.

Par rapport à l'augmentation des autres amino-acides, la leucine et l'iso-leucine sont anormalement peu concentrées chez les mutants, en conditions normales, alors qu'elles subissent les augmentations les plus fortes après atténuation de lumière (plus de 400 %). Leur participation spécifique aux troubles de la photosynthèse paraît donc très probable : cette hypothèse sera confirmée par la suite. Le maintien de la baisse du glycocolle en lumière atténuée peut s'expliquer par son utilisation dans la synthèse des proto-chlorophylles qui s'effectue à l'obscurité.

. Prolongation de l'atténuation de lumière

Chez les plants normaux, nous avons étudié sur un lot de graines de sélection plus récente l'effet du prolongement de la lumière atténuée.

L'atténuation de lumière pendant 5 H induit une baisse transitoire des teneurs en pigments plus prononcée avec 11 lux qu'avec 25 lux, c'est-à-dire, proportionnelle à la diminution d'énergie lumineuse. Simultanément, la synthèse protéique diminue et les concentrations en amino-acides libres augmentent d'autant, (Tableau VIII, (HT)), ce qui confirme la sensibilité du mécanisme au traitement lumineux.

Il est à remarquer que la valine et surtout l'iso-leucine et la leucine augmentent dans des proportions bien plus importantes que les autres amino-acides libres, ce qui fait penser à leur participation possible à la synthèse de molécules protéiques photo-dépendantes.

En lumière atténuée prolongée, bien que les teneurs en pigments remontent, les amino-acides libres continuent en général à s'accumuler, mais il ne s'agit, peut-être, que d'un décalage qui disparaît après analyse, au bout d'un temps plus long.

La proline est la seule à baisser régulièrement, et l'asparagine augmente, par contre, très fortement après prolongation de l'atténuation de lumière. Nous verrons, chez l'Orge, que cette mise en réserve d'asparagine est une caractéristique fréquente des mutants chlorophylliens. Un mutant d'*Arabidopsis* particulièrement riche en amides a, d'ailleurs, été déjà décrit (225).

c) Variations des sucres libres en lumière atténuée

L'affaiblissement de la photosynthèse conduit normalement à des variations de teneurs en sucres libres (Tableau IX (HT)).

Les résultats montrent qu'une courte atténuation de lumière entraîne une augmentation de teneur en glucose au détriment du fructose qui diminue dans les mêmes proportions : la somme Glucose + Fructose ne change presque pas. Le lactose tend à s'accumuler.

Les mutants présentent des réactions de même sens mais d'amplitude supérieure à celle des Témoins.

Le déséquilibre en faveur du glucose au détriment du fructose n'est pas suffisant pour comprendre le phénomène : en effet, en lumière atténuée prolongée ou accentuée, le fructose continue à baisser régulièrement, alors que le glucose amorce, lui aussi, une baisse :

Tableau (20) - Variations de teneurs en sucres chez les plants Témoins d'Arabidopsis placés en lumière atténuée courte et prolongée (nM/mg poids frais)

Conditions d'éclairement	5 H sous 11 lux	17 H sous 9,5 lux
Glucose (nM/mg)	4,16	2,16
Fructose (nM/mg)	1,63	1,14

En réalité, une courte atténuation avec 11 lux freine plus l'utilisation du glucose qu'avec 25 lux, mais, au bout de plusieurs heures, l'équilibre entre synthèse et consommation est renversé et sa teneur diminue. Le fructose voit aussi sa synthèse baisser d'une façon apparemment indépendante.

3° Conclusions

Nous avons dosé simultanément, dans les rosettes de feuilles d'Arabidopsis, les pigments chlorophylliens et caroténoïdes, les principaux cofacteurs, les sucres libres et les amino-acides libres : les bilans ainsi obtenus traduisent, chez les témoins et les mutants, un équilibre entre anabolisme et catabolisme.

Il est apparu principalement une relation entre pigments et amino-acides libres : ces derniers s'accumulent de façon plus prononcée en lumière atténuée, en particulier la leucine et l'iso-leucine. ...

Parallèlement à ces variations, les mutants montrent une augmentation d'activité phosphatasique et l'accumulation d'un dérivé phosphorylé (de type chroménol-Phosphate), alors que leur équipement chlorophyllien est nettement réduit, et que la leucine et l'iso-leucine en lumière normale ne suivent pas l'accroissement correspondant observé pour les autres amino-acides.

Ces résultats nous ont amené à envisager les relations pouvant exister entre amino-acides et phosphorylation dans le cadre de l'appareil photosynthétique, ainsi qu'un rôle particulier de la leucine et de l'iso-leucine à cet égard.

D - CARACTERISTIQUES SPECTRALES DES PIGMENTS ISOLES A PARTIR DES PLANTS D'ARABIDOPSIS NORMAUX ET MUTES (VIRIDIS)

Les chlorophylles (a) et (b), la lutéine, la violaxanthine et la néo-xanthine ont été isolées et purifiées à partir des extraits de rosettes normales et mutées. La comparaison de leurs spectres dans le méthanol et l'éther de pétrole (spectrophotomètre Cary, sensibilité D. O. = 0 à 0,1) n'a révélé aucune différence significative imputable à la mutation.

Les modifications observées dans l'équipement pigmentaire des mutants viridis sont donc limitées au domaine quantitatif et la structure chimique des composés étudiés ne paraît pas affectée, comme le montraient, d'ailleurs, les séparations chromatographiques.

CHAPITRE II

ETUDES SUR DES PLANTULES D'ORGE NORMALES ET MUTEES

- A - Etude biochimique des Témoins au cours du développement
- B - Etude de quelques mutants "Viridis" viables (V_1 , V_2 , V_3)
 - 1°) en conditions normales, aux stades 8 et 18 jours
 - 2°) au stade 12 jours en lumière atténuée de courte et longue durée
 - 3°) au stade 12 jours après ablation de la feuille cotylédonaire
 - 4°) au stade 12 jours en culture à basse température
- C - Propriétés spectrales des pigments chlorophylliens et caroténoïdes isolés chez les plants normaux et "Viridis"

A - ETUDE DES PLANTS NORMAUX AU COURS DU DEVELOPPEMENT

Nous avons désigné par C la feuille cotylédonaire et F(1), F(2) les feuilles suivantes.

1°) Taille et poids des plantes en fonction de l'âge

Sous un éclairage de 1500 lux pendant 15 H sur 24, à la température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, la germination est de 99 % en 2 jours. La feuille cotylédonaires croît très rapidement (2,5 à 3 cm par jour) pendant les premiers jours. La première feuille s'écarte du pied vers le 5ème jour et la seconde vers le 12ème jour. Les principaux résultats (Tableau X (HT)), sont résumés sur la figure (14).

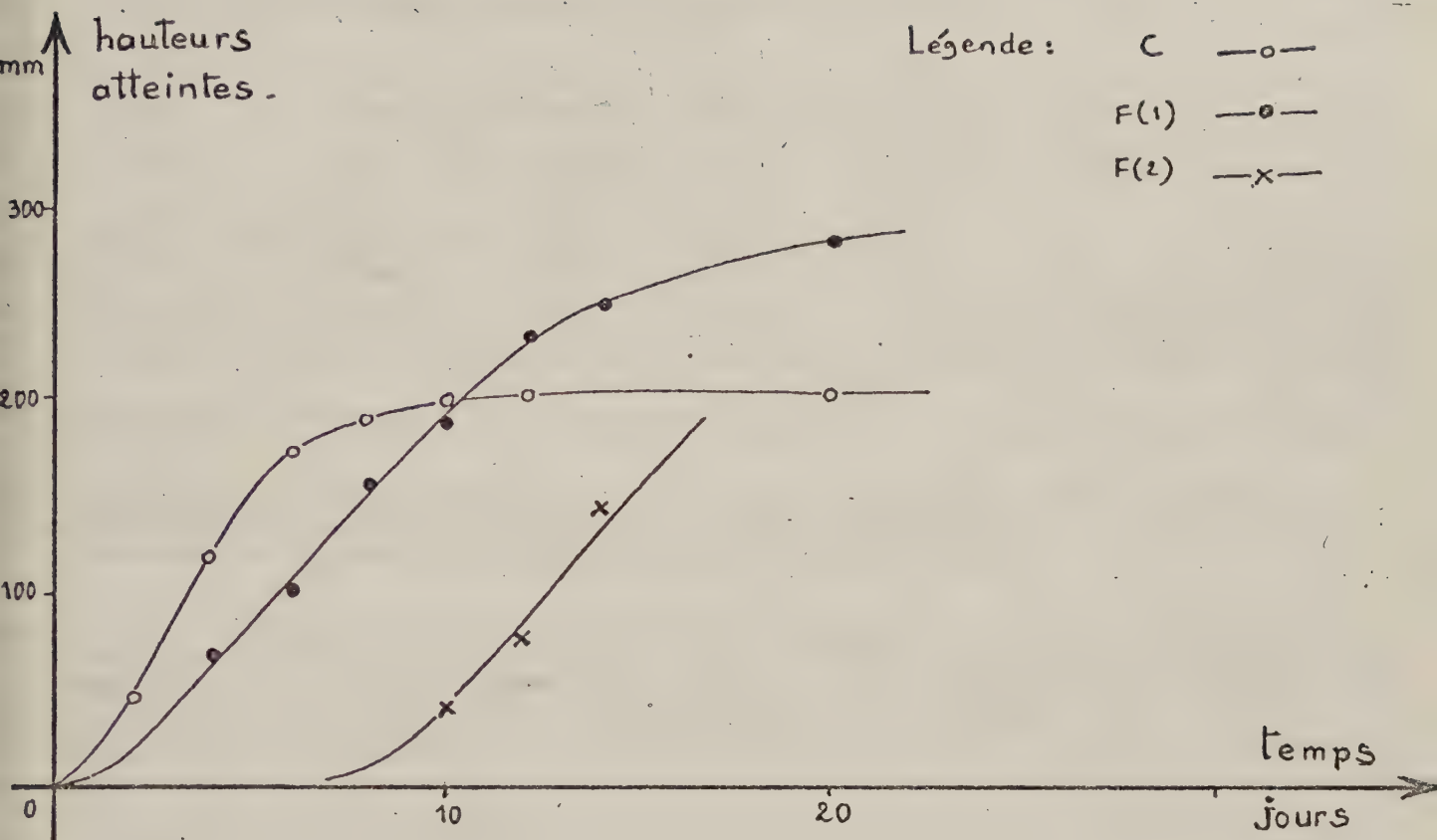


Fig. (14) - Schéma de la croissance des plants normaux d'Orge en conditions artificielles ($\pm 11\%$)

Comme pour l'*Arabidopsis*, la culture en cellules individuelles permet une excellente homogénéité du matériel dans des conditions physiques déterminées.

2°) Equipement en pigments chlorophylliens et caroténoïdes

Nous allons indiquer successivement la teneur totale des plants à différents stades physiologiques, puis les teneurs respectives spécifiques de la feuille cotylédonnaire, de la première feuille et de la seconde. Les résultats sont résumés dans les tableaux (20) et (21).

Il apparaît ainsi que la teneur en pigments chlorophylliens augmente très rapidement dans les 8 premiers jours. Cependant, au bout d'un mois, les cellules de cultures s'avèrent déjà trop petites pour contenir les plantes, et la quantité de milieu nutritif doit être augmentée, tandis que les plants commencent à s'affaiblir. Le stade 31 jours constituera la limite, pour nos expériences physiologiques.

Tableau (20) - Evolution des teneurs en pigments chez l'Orge (normal au cours du développement (teneurs en nM/mg plants entiers)

Pigments	Ages	4 jours	8 jours	12 jours	14 jours	24 jours	31 j.
Chlorophylle (a)		0,620	0,729	0,859	0,865	0,846	0,846
Chlorophylle (b)		0,151	0,353	0,450	0,450	0,556	0,556
Carotène		0,144	0,165	0,192	0,238	0,223	0,223
Lutéine		0,171	0,183	0,338	0,257	0,319	0,319
Viola-Xanthine		0,075	0,063	0,177	0,157	0,257	0,257
Néo-Xanthine		0,066	0,044	0,074	0,072	0,103	0,103

Tableau (21) - Teneurs spécifiques en pigments de la feuille cotylédonnaire et des premières feuilles de l'Orge à quelques stades (nM/mg d'organe disséqué)

Pigments	4 jours		8 jours		12 jours		14 jours		
	C	F(1)	C	F(1)	C	F(1)	C	F(1)	F(2)
Chlor. (a)	0,677	0,210	0,931	0,647	0,988	0,953	0,866	0,871	0,871
Chlor. (b)	0,163	0,025	0,423	0,303	0,510	0,491	0,403	0,42	0,37
Carotène	0,153	0,055	0,166	0,093	0,278	0,290	0,235	0,237	0,237
Lutéine	0,183	0,058	0,183	0,111	0,418	0,442	0,273	0,251	0,251
Viola-X.	0,079	0,033	0,055	0,089	0,238	0,266	0,147	0,165	0,165
Néo-Xanth.	0,070	0,032	0,044	0,066	0,118	0,119	0,068	0,079	0,079

L'examen de ces résultats montre que la croissance et la pigmentation des divers organes concourent à assurer une teneur générale stable (aussi constante que possible). Les feuilles successives vont vraisemblablement prendre le relais les unes des autres et maintenir la capacité pigmentaire de la plante à un niveau constant ou proportionnel à la croissance ultérieure des tissus, ceci dans le cas d'un développement normal (SESTAK, Z et VACLAVIK, J. 1965 (209)). Divers auteurs attribuent la maturité photosynthétique aux feuilles dont le limbe atteint 50 à 80 % de sa surface finale (BARUA, D 1960 HELSON, V. 1963 et SESTAK, Z. et VACLAVIK, J. 1965 (209)). Dans le cas de nos cellules de cultures, nous constatons que les deux premiers organes atteignent, au moment de leur "maturité", leur maximum de teneurs pigmentaires. Ceci est en accord avec la notion de proportionnalité entre photosynthèse et teneurs pigmentaires (SESTAK, Z. 1963)(209). Enfin, au cours de l'ontogénèse ou de la végétation, les échanges photosynthétiques augmentent puis s'abaissent, comme cela a été démontré chez divers végétaux dont certaines graminées telles que Zea mays. Chez l'Orge, un essai de GREGORY et RICHARDS (1929)(209)...

a montré un maximum à la 3ème feuille sous forte lumière, mais peu d'influence de l'âge à faible intensité : dans le cas de nos propres expériences, cette influence paraît également concluante sous faible intensité. Cependant, l'augmentation de l'énergie lumineuse peut d'autant plus dilater le phénomène que les teneurs en pigments sont très fortement accrues comme le montre le tableau suivant.

Tableau (22) - Comparaison des teneurs pigmentaires de l'Orge dans deux conditions d'éclairement différentes :

faible éclaircissement : 1800 lux 15 H sur 24

fort éclaircissement : 3000 lux 19 H sur 24

Teneurs en nM/mg poids frais au stade 8 jours

Paramètres	Chlor(a)	Chlor.(b)	Carotène	Lutéine	Viola-X.	Néo-Xanth
3000 Lux ...	1,11	0,27	0,30	0,334	0,18	0,088
1800 Lux ...	0,67	0,25	0,15	0,175	0,07	0,05

Il apparaît immédiatement que, sous forte lumière, les teneurs en chlorophylles atteignent le niveau observé chez Arabidopsis alors que les caroténoïdes augmentent beaucoup plus. Dans les conditions habituelles pour l'Orge (faible intensité - 15 H de jour), les teneurs en caroténoïdes sont comparables à celles d'Arabidopsis et les taux de chlorophylles nettement inférieurs. Cette observation est propre aux conditions artificielles : les taux de pigments sont beaucoup plus élevés lors de cultures en serre, par exemple, en particulier sur un support nutritif riche (terreau).

. Evolution des cofacteurs

Le tableau (23) donne un aperçu des variations des principaux composés qui nous intéressent et qui correspondent à ceux déterminés chez Arabidopsis

Tableau (23) - Evolution de quelques cofacteurs au cours du développement de l'Orge

Stades	6 jours	12 jours	18 jours	21 jours	24 jours
Tocophéryl-chroménol	3,67	3,03	3,47	4,65	-
Plasto-chroménol	0,76	2,85	3,74	-	2,0
Plastoquinone A	0,02	0,17	0,17	-	-

Notons l'accroissement général, cependant tempéré pour le Tocophéryl-chroménol au 12ème jour, soit au démarrage de croissance de la 2ème feuille.

3°) Teneurs en amino-acides libres chez l'Orge

Le tableau XII (HT) indique les variations de concentration en amino-acides libres au cours du développement, aux stades 8-12-24-31 jours pris comme points de repère. Au stade 8 jours, les analyses ont été effectuées également dans les conditions de fort éclaircissement (utilisées pour Arabidopsis). Ces observations ont pour objet principal de contrôler les relations entre chlorophylles et amino-acides déjà démontrées chez Arabidopsis.

Les résultats confirment les relations déjà démontrées chez Arabidopsis. La concentration en amino-acides diminue quand la teneur en chlorophylles augmente, et au stade 31 jours, nous nous trouvons sans doute à un minimum, compte tenu de nos conditions de cultures. A ce stade, la diminution de teneur en amino-acides est ralentie, voire inversée. Comme précédemment, l'ornithine et la proline ne suivent pas ce phénomène, de même que la phényl-alanine, l'alanine et l'acide γ amino-butyrique : leur rôle ou leur dépendance vis à vis de la photosynthèse doit être certainement différents de celui des autres. Ici, le tryptophane suit une relation en fonction directe de la concentration en chlorophylles.

Parmi les relations les plus démonstratives, nous trouvons celle de l'acide aspartique (fig. 15) dont la courbe, en fonction des concentrations pigmentaires, est de type hyperbolique, ainsi que le montre le graphique en coordonnées semi inversées (fig. 15.b)

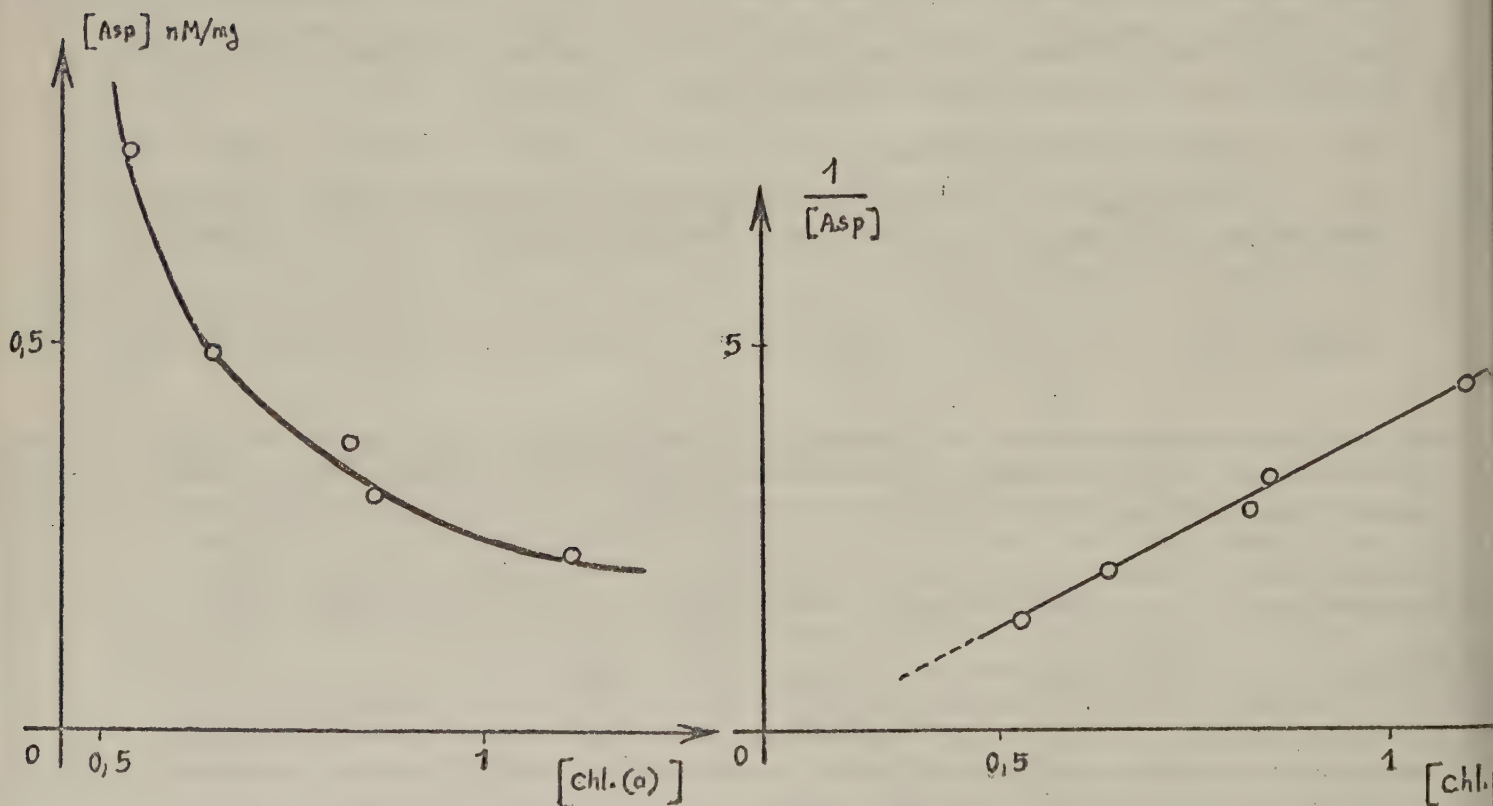


Fig. (15) - Variation du métabolisme de l'acide aspartique en fonction des teneurs en chlorophylle (a) chez l'Orge ...

Sous l'angle des notions actuelles de carboxylation du phospho-énol-pyruvate (cycle C_4) (99), cette observation tendrait à plaider en faveur d'une prédominance du type C_3 chez l'Orge (témoins).

4°) Teneurs en sucres libres chez l'Orge

Le tableau (24) résume quelques résultats obtenus à divers stades : 4-8-12-20-24-31 jours

Tableau (24) - Variations de teneurs en sucres libres au cours du développement de l'Orge (en nM/mg de poids frais)

Ages	Saccharose	Glucose	Fructose	Ribose
4 jours	1,37	13,6	4,77	0,24
8 jours	-	5,6	2,94	-
12 jours	-	4,7	3,00	0,15
21 jours	0,35	5,8	4,22	0,231
24 jours	0,48	22,4	11	0,234
31 jours	0,24	14,7	13	0,084

Grâce à leurs réserves cotylédonaire, sans aucun doute, les très jeunes plants sont riches en sucres (surtout glucose et saccharose). Par la suite, tout comme chez Arabidopsis, le fructose s'accumule régulièrement, alors que le glucose passe par un minimum au moment du maximum de photosynthèse et de la formation de la 2ème feuille (début de croissance rapide).

5°) Activité phosphatasique des plants normaux

Une étude détaillée sera présentée dans la 3ème partie : elle concernera le mécanisme de régulation de cette activité et l'application aux mutants. Nous présentons, ici, les paramètres déterminés chez les plants normaux : cinétique d'activité et constante de Michaelis apparente vis à vis du p. Nitro Phényl-Phosphate dans le tampon TRIS 0,2 M pH 7,55.

La concentration de l'extrait enzymatique (poudre acétonique) correspond à 200 mg/ml en tissus frais. Les principaux résultats sont les suivants :

- Vitesse maximum : $3,37 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$ Moles de pNP apparu/l./H
- $K_m = 12,02 \pm 1,06 \cdot 10^{-3}$ M. (en pNPP)

Ces résultats appellent principalement la remarque suivante : la phosphatase de l'Orge travaille 20 fois plus lentement que celle d'Arabidopsis, mais nécessite 200 fois plus de substrat pour atteindre sa vitesse maximale. Or Arabidopsis croît très vite (cycle 45 jours) mais sa taille est très faible, ce qui correspond point par point à la comparaison des possibilités respectives des enzymes de l'Orge et d'Arabidopsis. (Rappelons que les concentrations des extraits enzymatiques d'Arabidopsis favorables aux analyses sont de 20 mg seulement de tissus frais par cm^3).

...

6°) Conclusions

Nous avons retrouvé chez l'Orge, les mêmes types de comportements biochimiques que chez Arabidopsis. Les seules différences tiennent à la cinétique de croissance plus lente chez l'Orge, sur le plan des stades physiologiques : en effet, nous n'avons considéré qu'une partie du développement végétatif sans atteindre le stade floral. Cependant, la vie propre de chaque type de feuilles peut être considérée d'une façon relativement indépendante (209). La feuille cotylédonaire et la première feuille ont été les plus utilisées au cours de nos recherches. Les analyses ont porté sur les deux à la fois, tenant compte du fait que l'effet de l'âge des feuilles sur la photosynthèse ne s'observe pas lorsque la quantité de lumière fournie est limitant (moins de 3 à 5000 lux) (ORMROD, 1964) (209).

B - ETUDE DE QUELQUES MUTANTS VIRIDIS VIABLES

INTRODUCTION

Nous avons étudié 3 types de mutants viridis désignés par V_1 - V_2 - V_3 dans l'ordre des fertilités décroissantes (environ 100 %, 36 % et 5-10 % respectivement du nombre de graines des témoins). Nous présenterons, ici, une comparaison en conditions normales de cultures aux stades 8 jours et 12 jours, ainsi que quelques particularités apparues à des stades ultérieurs qui seront décrits en détails lors d'études physiologiques dans la 2ème et la 3ème partie de ce travail.

Au stade 12 jours, les comparaisons ont été effectuées en lumière normale et atténuée ainsi qu'à basse température, avec comme conséquence une application à l'amélioration du métabolisme du mutant V_1 .

1°) Etude des mutants aux stades 8 et 12 jours en conditions normales

a) Morphologie des plants normaux et mutés

Aux stades 8 et 12 jours, seule la 1ère feuille des mutants V_2 et V_3 présente un retard de croissance significatif par rapport aux témoins. (Tableau XIII (HT)).

b) Pigments et cofacteurs

Tous les pigments chlorophylliens et caroténoïdes sont en concentration réduite de 25 à 50 % chez les mutants, principalement V_1 et V_3 au stade 8 jours, et V_1 et V_2 au stade 12 jours. Seules, la lutéine et la viola-xanthine ne changent pas chez V_2 à 8 jours (Tableau XIV (HT)). Entre la germination et le stade 8 jours, les teneurs en pigments sont assez variables (± 16 %) : elles sont plus homogènes après le stade 12 jours (mieux que 10 %).

Le cofacteur le plus abondant chez les jeunes plants est le Tocophéryl-chroménol : sa teneur est augmentée chez V_1 et V_2 par rapport aux témoins, au stade 8 jours, mais elle baisse significativement dès le stade 12 jours (Tableau XV (HT)). Chez V_1 , la teneur passe de 44 à 100 % du 8ème au 12ème jour, mais elle baissera à nouveau aux stades ultérieurs.

Chez les plants jeunes, l'influence des réserves cotylédonaire est certainement encore très sensible. Selon les conditions de cul-

tures, ces réserves peuvent être épuisées plus ou moins rapidement, et le métabolisme en est modifié d'autant. Les premiers stades de croissance seront donc relativement les plus délicats à étudier : un très bon contrôle des paramètres de cultures sera notamment indispensable. Nous verrons, cependant, que les fluctuations ne sont très sensibles qu'au niveau des pigments.

c) Amino-acides libres

Comme dans le cas d'Arabidopsis, les mutants d'Orge présentent une augmentation générale de teneur en amino-acides.

Au stade 8 jours, seule la proline fait exception (Tableau XVI (HT)). La leucine et l'iso-leucine augmentent de 50 % chez V_2 et de 100 % chez V_1 et V_3 par rapport aux témoins.

Au stade 12 jours, la proline et l'acide γ amino-butyrique diminuent chez tous les mutants, de même que la leucine et l'iso-leucine, ce qui nous rapproche du cas d'Arabidopsis. La méthionine, la phénylalanine et l'acide α amino-butyrique diminuent chez V_2 et V_3 seulement (Tableau XVII (HT)).

Les mutants accumulent tous une quantité importante d'asparagine : leur excès de teneur en amino-acides les conduit, peut-être, à emmagasiner l'ammoniac sous forme de réserve. Cependant, la glutamine devrait alors subir la même concentration, ce qui n'est pas le cas : l'accumulation d'asparagine nous paraît donc revêtir un caractère plus spécifique des troubles de la photosynthèse.

Tous les autres amino-acides sont plus ou moins accumulés chez les Mutants, et, généralement de façon croissante quand on passe de V_1 à V_3 (avec quelques interversions dont la signification est discutable).

Si le sens de variation ainsi observé est conforme au degré d'affaiblissement des plants (fertilité réduite de V_1 à V_3), il ne suit pas les variations de teneurs pigmentaires contrairement à ce que pouvait nous laisser prévoir la relation inverse démontrée chez les plants normaux. Ceci nous amène à considérer la possibilité d'un rapport entre chlorophylles totales et chlorophylles physiologiquement fonctionnelles : les formes utiles seraient celles situées sur le complexe chromoprotéique contenant tout l'équipement photosynthétique, tel qu'il a été décrit sous diverses formes, ou par fragments, par VERNON et Coll. 1969 (236), LEGGETT BAILEY et KREUTZ, 1969 (10), BRIANTAIS, 1968 (33). Nous avons pu isoler chez l'Orge un tel complexe, après extraction selon une technique de KHAU VAN KIEN (131) à l'acétone - 50 % et purification sur colonne de Sephadex G25 et G200. Après séparation des divers éléments constitutifs du complexe, nous avons identifié, en dehors de la fraction protéinique :

chlorophylles (a) et (b)
lutéine
violaxanthine
néoxanthine
carotène
5 dérivés de type Plastoquinones et Chroménols

Or, le complexe ne paraît pas contenir absolument la totalité des pigments, ce qui renforce l'hypothèse sur les formes fonctionnelles et peut-être "de réserve". La technique d'isolement à l'acétone (KHAU VAN KIEN), ainsi que les résultats sur la composition du complexe, sont confirmés par les travaux de LEGGETT BAILEY (1969)(9) et de THOMAS et BARTELS (1969)(229). En conclusion, il est permis de penser que les diverses relations physiologiques ne concernent, en...

principe, que des produits physiologiquement actifs dans le métabolisme.

d) Sucres libres

Au stade 8 jours, le mutant V_3 contient plus de saccharose que V_1 , V_2 et les Témoins, et le fructose tend à s'accumuler chez tous les mutants (Tableau XVII (HT)). Ces caractéristiques se retrouvent fréquemment par la suite. Le glucose, par contre, est augmenté chez V_1 , inchangé chez V_2 et diminué chez V_3 par rapport aux témoins : sa teneur décroît en fonction du degré de stérilité.

Au stade 12 jours, les teneurs en glucose remontent chez les mutants, (de même que celles en ribose), ce qui traduit soit une consommation réduite, soit une synthèse accrue (Tableau XIX (HT)). Dans ce dernier cas, la faiblesse de l'équipement photosynthétique des mutants ne permet pas de fournir une explication et il faut admettre l'existence d'une autre voie que la photosynthèse : cette hypothèse sera confirmée par la suite (avec le ^{14}C).

2°) Etude des Mutants au stade 12 jours en lumière atténuée de courte et longue durée

Les lots de cultures ont été placés respectivement en lumière atténuée :

{ de courte durée : 5 H sous 11 lux
 { de longue durée : 17 H sous 9,5 lux

La taille des plantes n'est pas affectuée dans le 1er cas ; en lumière atténuée prolongée, seule la 1ère feuille présente un retard de croissance chez V_2 et V_3 .

a) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Une courte atténuation de lumière entraîne une baisse de teneurs en chlorophylles (a) et (b), de l'ordre de 25 à 35 %, ainsi qu'une diminution du tocophéryl-chroménol (Tableau XX (HT)). Les caroténoïdes sont très peu affectés ; on assiste même à un accroissement général chez V_1 . La baisse de teneurs en chlorophylles peut s'expliquer en partie, et chez les mutants seulement, par une transformation en phéophytine, comme le montre le tableau ci-dessous, où les teneurs en lumière normale sont rappelées entre parenthèse.

Tableau (25) - Teneurs maximum possibles de chlorophylles chez les plants d'Orge normaux et mutés placés en lumière atténuée de courte durée, après avoir reconverti les taux de phéophytines en chlorophylles (nm/mg)

Pigments (+Phéophytine)	Témoins	V_1	V_2	V_3
Chlor. (a)	0,59 (0,64)	0,46 (0,34)	0,39 (0,37)	0,45 (0,50)
Chlor. (b)	0,31 (0,38)	0,23 (0,21)	0,24 (0,23)	0,33 (0,29)

Chez les plants normaux, il a dû se produire, en outre, une réduction de synthèse pigmentaire ou une dégradation de la phéophytine elle-même.

En lumière atténuée prolongée, les concentrations pigmentaires remontent jusqu'à dépasser les valeurs normales, sauf le cas de la lutéine et de la violaxanthine chez V_2 (Tableau XXI (HT)) et la phéophytine tend à disparaître. Cette réaction de compensation est plus prononcée chez les mutants que chez les plants normaux.

Au niveau des cofacteurs (Tableau XXII (HT)), une apparition massive de plasto-chroménol traduit l'état anormal du système photosynthétique, malgré la restauration des taux de chlorophylles. Les autres chroménols, légèrement diminués chez V_1 par rapport aux témoins, augmentent progressivement chez V_2 et surtout chez V_3 . L'importance du plastochroménol se précisera² dans les chapitres suivants.

En définitive, le sens des variations observées au niveau des pigments et cofacteurs rappelle très nettement les résultats déjà obtenus chez Arabidopsis.

b) Amino-acides libres

En lumière atténuée de courte durée, les amino-acides libres varient relativement peu par rapport aux conditions de lumière normale (Tableau XXIII (HT)). L'asparagine, l'alanine, la sérine, la phényl-alanine et le tryptophane ont tendance à baisser, surtout chez les mutants. Cependant, quelques accumulations sont relevées pour l'acide aspartique chez les témoins et V_1 , la leucine chez V_2 et V_3 et l'iso-leucine dans tous les cas.

Enfin, les teneurs n'augmentent systématiquement, en fonction du degré d'affaiblissement (soit des témoins aux mutants $V_1 - V_2 - V_3$) que pour la valine, la leucine et l'iso-leucine.

En lumière atténuée prolongée, ceux des amino-acides qui n'avaient pas - ou peu - réagi en courte durée, voient leurs teneurs remonter ; les augmentations les plus importantes concernent la leucine (250 à 350 %) et l'iso-leucine (150 à 250 %), tandis que la proline diminue dans tous les cas (tableau XXV (HT)).

Ces observations montrent une bonne concordance avec les résultats obtenus chez Arabidopsis. Cependant, l'Orge croît plus lentement et les réactions physiologiques montrent une cinétique plus lente. Ainsi, la courte atténuation de lumière n'a permis de saisir que les toutes premières manifestations au niveau des amino-acides libres, ce qui confirme ainsi le caractère plus photosensible de la leucine et de l'iso-leucine.

c) Sucres libres

Après 5 H de lumière atténuée, le mutant V_1 reste très proche des témoins, tandis que V_2 et V_3 accusent une baisse notable de teneur en glucose, ce qui confirme l'altération plus prononcée de leur potentiel de biosynthèse (Tableau XXIV (HT)). Remarquons que l'ordre d'altération croissant serait à mettre en relation avec la chlorophylle (a) plutôt qu'avec la (b) (Tableau XX (HT)).

Après 17 H de lumière atténuée, les mutants V_2 et V_3 contiennent toujours moins de glucose et fructose que les plants témoins, mais les teneurs amorcent une nette remontée (Tableau XXVI (HT)), comme chez l'Arabidopsis : ceci évoque à nouveau l'hypothèse d'une autre voie de biosynthèse que la carboxylation.

3°) Etude des mutants après ablation de la feuille cotylédonaire (stade 12 jours)

Au cours des rappels bibliographiques nous avons signalé le rôle biochimique important que pourrait jouer la feuille cotylédonaire vis à vis des feuilles suivantes, et l'incidence que cela pourrait avoir sur l'étude des mutations. Nous avons donc voulu vérifier le comportement biochimique de la première feuille 4 heures après ablation de la feuille cotylédonaire.

- Eclairement : 1800 ± 200 lux
- Photopériode : 15 H sur 24
- Morphologie des plants avant ablation (mm) :

organe	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
C	203 ± 20	205 ± 10	$212,5 \pm 7,5$	$207,5 \pm 7,5$
F(1)	227 ± 17	242 ± 7	185 ± 25	160 ± 45

a) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Tableau (26) - Equipement pigmentaire des plants normaux et mutés après ablation de la feuille cotylédonaire, dans la 1ère feuille (nM/mg)

Pigments	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Chlor. (a)	0,665	0,752	0,533	0,587
Chlor. (b)	0,278	0,332	0,197	0,222
Carotène	0,129	0,131	0,110	0,14
Lutéine	0,221	0,232	0,190	0,205
Viola-X.	0,123	0,123	0,074	0,082
Néo-Xanth.	0,098	0,074	0,044	0,053
Phéophytine	0,0	0,032	0,068	0,033

Nous assistons à un effort de renforcement des chlorophylles destiné, peut-être, à compenser l'arrêt des apports métaboliques de la première feuille. Cependant, V₂ et V₃ conservent relativement moins de chlorophylle (b) que les témoins.

Les cofacteurs sont principalement représentés par le tocophéryl-chroménol dont voici les teneurs en nM/mg :

Plants	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Toco-chroménol	2,90	3,0	3,14	4,2

Seul le mutant V₃ présente une augmentation significative qui traduit à nouveau son altération plus prononcée de l'appareil photosynthétique.

b) Amino-acides libres

Les résultats numériques de la comparaison des teneurs en amino-acides libres dans les feuilles F (1) normales et mutées après ablation de la feuille cotylédonnaire sont consignés dans le tableau XXVII (HT).

Par comparaison avec la plante entière, la lère feuille contient de nombreux amino-acides en plus grande quantité, à l'exception de l'ornithine (chez V₁-V₂-V₃), l'histidine (chez V₂), l'asparagine (qui augmente chez les témoins mais chute de 45% chez tous les mutants), l'acide γ amino-butyrique (réduit partout) et la méthionine.

L'iso-leucine et la leucine conservent les mêmes proportions relatives chez les mutants par rapport aux témoins, mais leurs teneurs augmentent de 2,5 à 5 fois selon les cas (7 fois pour l'iso-leucine des témoins).

Un rapprochement peut être effectué avec les résultats en lumière atténuée prolongée, d'où il ressort que les variations sont souvent du même ordre, exception faite de l'asparagine qui est réduite dans la lère feuille tandis que la valine, au contraire, double sa concentration, de même que la proline qui augmente de près de 10 fois chez V₂ et V₃, ce qui rappelle les observations de PERDRIZET et coll. 1965 (184) sur un mutant de blé Xantha.

c) Sucres libres

Les résultats font apparaître un caractère qui se répètera par la suite dans diverses conditions : l'accumulation de saccharose (8 fois) chez le mutant V₃ (Tableau XXVIII (HT)). Cette augmentation n'est pas due à un défaut de capacité de V₃ à hydrolyser ce diholoside, (comme c'était le cas pour les mutants de tomate de LEFORT et coll. 1958 (153)), car le glucose y est encore abondant par rapport aux autres plants normaux et mutés. Cependant, il pourrait se produire une dissociation du métabolisme du glucose, du fructose et du saccharose qui reste à expliquer, mais qui est certainement reliée à l'abaissement au degré de différenciation biochimique chez les mutants chlorophylliens.

4°) Etude biochimique des plants normaux et mutés cultivés à basse température (stade 12 jours)

La Bibliographie nous a montré, en effet, que la température peut modifier l'expression biochimique d'une mutation, soit en l'accroissant (111)(146) soit en l'atténuant (179)(190).

Les plants d'Orge normaux et mutés ont été placés avant analyse, du 8ème au 12ème jour, dans une pièce à $14 \pm 1^\circ\text{C}$. Nous avons pu disposer alors d'un éclaircissement un peu inférieur à 1000 lux avec une photopériode de 9. H.

Morphologie : (mm)

	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
C	197 $\pm$ 8,8	188,3 $\pm$ 20	205 $\pm$ 8,8	174,2 $\pm$ 32
F(1)	173,4 $\pm$ 3	179 $\pm$ 20	134,5 $\pm$ 52	111 $\pm$ 53

a) Pigments et cofacteurs

Par comparaison avec les plants cultivés à 20°C , le mutant V₃ n'accuse qu'une légère augmentation de chlorophylle (a), mais chez V₁ et V₂ les formes (a) et (b) sont nettement augmentées tandis qu'elles diminuent chez les normaux (Tableau XXIX (HT)). Les teneurs en β carotène augmentent partout au détriment de la lutéine qui diminue, sauf chez V₁.

Tableau (26) - Teneurs en caroténoïdes à 15°C rapportées aux valeurs obtenues à 20°C chez les témoins et mutants d'Orge

Rapports $\frac{15^\circ\text{C}}{20^\circ\text{C}}$	T.	V ₁	V ₂	V ₃
β Carotène	145 %	133 %	106 %	186 %
Lutéine	77 %	133 %	74 %	90 %
Viola-X. + Néo-X.	97 %	167 %	72 %	124 %

La teneur totale en hydroxycaroténoïdes diminue chez les témoins et V₂ au profit du β carotène : cette double parenté T-V₂ et V₁-V₃ se retrouvera au cours d'expériences sur l'inhibition de la phosphorylation.

La faible intensité lumineuse n'a pas été défavorable aux chlorophylles, de même que le froid, car il ne s'est pas formé de phéophytine contrairement aux essais de la lumière atténuée.

Une réaction plus significative du froid s'est traduite au niveau des cofacteurs :

Tableau (27) - Influence du froid sur les cofacteurs : teneurs en nM/mg chez les plants d'Orge normaux et mutés.

Composés	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Tocophérylyl-Chroménol	2,1	1,06	0,80	0,78
Plasto-Chroménol	14,3	20,5	24,3	28,2

Le tocophéryl-chroménol forme physiologique active, disparaît sous l'effet du froid et de façon croissante, des témoins à V_1 - V_2 - V_3 , pour laisser place à une considérable accumulation de plasto-chroménol qui se confirme ainsi comme étant une forme de réserve ou d'attente, ce rôle ayant déjà été suggéré par KHAU VAN KIEN sur le chêne vert (131).

La mise en réserve observée chez les Mutants correspondrait à des conditions plus dures chez les plants normaux (de 43 % à près de 100 % de plus). L'affaiblissement progressif du métabolisme de V_1 , V_2 et V_3 est en relation avec leur pouvoir de reproduction. On pourrait s'attendre à ce que l'équipement pigmentaire soit réduit progressivement en allant de V_1 à V_3 , ce qui n'est pas le cas : ceci nous ramène donc à l'hypothèse des formes physiologiques actives de pigments chlorophylliens, que nous essaierons d'explicitier dans la conclusion du chapitre.

b) Amino-acides libres

Tous les plants tendent à emmagasiner de l'asparagine qui pourrait avoir là aussi un rôle de réserve, de même que la glutamine. Mais de nombreux autres amino-acides s'accumulent aussi, proportionnellement plus chez les plants normaux que chez les mutants, ce qui tend à limiter les écarts initiaux. Cela évoque l'idée d'un "plafond" d'accumulation des amino-acides, le maximum étant plus vite atteint chez les mutants en raison de leur teneur élevée, dans les conditions normales.

La proline et l'acide γ amino-butyrique suivent à nouveau une variation en sens inverse.

c) Sucres libres

Dans les conditions de vie plus difficiles, les plantes contiennent moins de glucose ainsi que de fructose, mais, pour ce dernier, de façon moins prononcée, de sorte que les rapports glucose/fructose peuvent même s'inverser comme l'indiquent les chiffres ci-dessous :

		Témoins	V_1	V_2	V_3
[Glucose]	20° C	1,54	1,35	1,355	1,4
[Fructose]	15° C	1,13	1,07	0,66	0,71

Là encore, l'effet se fait sentir plus nettement chez les mutants les plus affaiblis par la mutation : V_2 et V_3

C - CARACTERISTIQUES SPECTRALES DES PIGMENTS ISOLES A PARTIR DES PLANTS D'ORGE NORMAUX ET VIRIDIS

Comme chez l'Arabidopsis, les critères spectrophotométriques aussi bien que les propriétés chromatographiques n'ont pas révélé de différences de structure entre les pigments des plants normaux et mutés. Dans le cas de l'Orge, cette analyse a pu être étendue aux plastoquinones et aux chroménols en raison d'une plus grande quantité de matériel disponible. Les conclusions n'ont pas changé quant à la nature quantitative et non qualitative des modifications observées chez les Mutants.

CHAPITRE III

ETUDE DE QUELQUES MUTATIONS CHLOROPHYLLIENNES PLUS AVANCEES, VERS LES TYPES "Xantha" ET "Albina"

A - Etude en lumière normale

B - Etude en lumière atténuée

INTRODUCTION

Les mutations chlorophylliennes présentant une différenciation plus restreinte du plastidome qui se traduit par les caractères Xantha puis Albina, ne sont en général pas viables. La survie et la reproduction des mutants nécessitent, en général, une greffe sur des plants normaux (142) et, dès lors, les conditions physiologiques de survie ou de reverdissement ne peuvent plus être déterminées artificiellement avec certitude. Nous n'avons donc pas basé nos recherches sur ces cas extrêmes, mais il nous a paru intéressant, cependant, d'étudier la limite des perturbations métaboliques dans les cas de mutants chlorophylliens de caractère de plus en plus accentué.

Nous avons étudié 4 mutants désignés par $M_4 - M_5 - M_6 - M_7$
d'aspects respectifs de type (viridis clair
(virido-Xantha
(Xantha pur
(Albino-viridis (1 petite ligne verte)

et dont l'aspect morphologique des plants n'est pas modifié. Nous avons exclu certains mutants à formes de feuilles particulières qui superposent des problèmes morphologiques aux problèmes biochimiques, ce qui complique l'interprétation des résultats.

Ces mutants, récoltés en serre avec les témoins correspondants, ont été repiqués sur notre milieu artificiel au stade 7 jours et analysés au stade 18-19 jours.

A - ETUDE EN LUMIERE NORMALE

1°) Morphologie moyenne du lot

La teneur en eau oscille autour de $92 \pm 1\%$ pour les mutants et $93 \pm 1\%$ pour les plants normaux.

La taille des mutants est très sensiblement réduite et les réserves cotylédonaire ne peuvent donc assurer une croissance même provisoirement normale. Le délai de survie maximum est de 1 mois. La taille et le poids des plants figurent dans le tableau XXXII (HT)

2°) Pigments et cofacteurs

Les chlorophylles (a) et (b) et la viola-xanthine sont absentes chez les Xantha (M₅ et M₆). L'ensemble des pigments est en teneur fortement diminuée chez tous les mutants, mais la chlorophylle (b) est moins atteinte dans le cas de l'abo-viridis M₇ que dans le cas de M₄ (viridis) (Tableau XXXII (HT))

Les principaux cofacteurs identifiés sont le tocophéryl-chroménol et le plasto-chroménol, dont les teneurs sont indiquées ci-dessous :

Tableau (28) - Les cofacteurs des Mutants M₄, M₅, M₆, M₇ déterminés en lumière normale (nM/mg)

Composés	Témoins	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇
Toco-chroménol	2,88	2,2	2,3	3,1	3,9
Plasto-chroménol	5,58	3,62	5,32	0,5	0,8

Les différences observées sont bénignes en comparaison de celles affectant les pigments, en ce qui concerne le tocophéryl-chroménol. La teneur est seulement augmentée de 25 % chez M₇.

Le plasto-chroménol, par contre, est réduit 9 fois chez M₆ et 7 fois chez M₇, ce qui laisse entrevoir une anomalie dans la chaîne des transporteurs de liaisons phosphoriques et nous permettra peut-être, de déduire un ordre de passage sur la voie conduisant à l'ATP.

Une étude ultérieure, en particulier à l'aide du ³²P, serait nécessaire pour déterminer si le plasto-chroménol dont la teneur est nettement réduite chez M₆ et M₇, est sous forme libre ou phosphorylée : s'il s'agit du produit phosphorylé, le passage aux formes actives doit être simplement réduit, et si le produit est libres, cela doit traduire un défaut de phosphorylation.

3°) Amino-acides libres

L'examen des résultats (tableau XXXIV (HT)) appelle principalement les remarques suivantes :

La réduction très importante des teneurs pigmentaires chez les mutants s'accompagne, ici encore, d'une augmentation très importante de teneur en amino-acides libres, mais pas toujours de façon proportionnelle à la réduction de pigments.

Les augmentations les plus importantes par rapport aux témoins concernent :

- l'asparagine de 414 à 580 %
- le tryptophane de 360 à 500 %
- la phényl-alanine de 265 à 440 %
- la leucine de 180 à 400 %
- la valine de 260 à 380 %
- l'histidine de 250 à 370 %
- l'acide aspartique de 200 à 280 %
- l'iso-leucine de 200 à 255 %

Quatre exceptions sont à remarquer, elles concernent :

- l'acide glutamique (55 à 90 %)
- l'alanine (45 à 100 %)
- la proline chez V₄ (51 %)
- l'acide γ amino-butyrrique (de 12 à 28 % qui présente une très faible teneur chez tous les mutan

4°) Sucres libres

La faiblesse du potentiel photosynthétique se révèle, ici, nettement, avec des teneurs en glucose oscillant entre 26 et 36 % des valeurs témoins, et des teneurs en fructose avoisinant 10 % de celles des plants normaux. De plus, une partie au moins de la synthèse protéique semble réduite, ce que traduit l'augmentation de teneur en ribose (non incorporé dans les acides nucléiques, par exemple).

B - ETUDE EN LUMIERE ATTENUÉE

Les plants, prélevés dans le même lot que précédemment, ont été placés en lumière atténuée avant l'extraction.

1°) Pigments et cofacteurs

La diminution de teneurs en chlorophylles (a) et (b) observée chez les témoins se produit aussi chez M₄ et chez M₇ (sauf pour la chlorophylle (a) dans ce dernier cas) (Tableau XXXVI⁷(HT)).

Par contre, M₅ synthétise les chlorophylles, ainsi que la violaxanthine qui lui manquaient totalement en lumière normale, mais perd du carotène et de la lutéine.

A l'exception du cas de M₅, les caroténoïdes sont diminués dans presque tous les cas, y compris celui de V₆ qui se vide de plus en plus de ses pigments.

L'atténuation de lumière a donc produit, dans le cas du mutant M₅, une amélioration apparente qualitative de l'équipement pigmentaire photosynthétique.

Les teneurs en cofacteurs analysés dans les mêmes extraits sont indiqués ci-dessous en nM/mg

Composés	Témoins	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇
Tocophéryl-chroménol	1,67	1,91	2,07	4,13	1,48
Plasto-chroménol	15,9	7,3	11,6	5,57	2,67

Par rapport aux conditions de lumière normale, le tocophéryl-chroménol tend à diminuer au profit de la forme plasto-chroménol qui apparaît en quantité importante même chez M₆ et M₇ qui en étaient presque dépourvus.

L'amplitude des variations respectives (et opposées) de ces deux composés, donne à penser, par leur différence d'échelle, qu'il n'existe pas une relation simple entre eux (de type stœchiométrique).

que par exemple). Par contre, le tocophéryl-chroménol selon sa concentration, pourrait activer ou inhiber l'accumulation de plasto-chroménol formé à partir d'un précurseur non identifié, selon un processus faisant intervenir un pro-enzyme ou zymogène, dont l'activation serait contrôlée par divers facteurs dont : les conditions physiques externes (température, lumière) et la concentration d'autres cofacteurs présents dans les cas de conditions favorables et exerçant par exemple, un effet répresseur dans ces conditions, sur la synthèse du pro-enzyme.

2°) Amino-acides libres

Nous assistons, ici, à une véritable "inversion" du métabolisme des mutants par rapport aux témoins : alors que chez ces derniers, s'amorce nettement, l'augmentation attendue de teneurs en amino-acides libres sous l'effet de la lumière atténuée, les mutants présentent, dans de nombreux cas, la réaction opposée (Tableau XXXVI (HT)). Le tableau (30) donne les pourcentages de variations observées chez les témoins et les mutants en lumière atténuée par rapport aux teneurs en conditions normales.

Tableau (30) - Variations relatives de teneurs en amino-acides libres dans les plants d'Orge normaux et mutés :

[C.] Lumière atténuée %
[C.] Lumière normale

Amino-Acides	Témoins	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇
Ornithine	164	107	153	115	144
Lysine	166	105	87	98,5	166
Histidine	135	67	116	67,7	95,5
Arginine	143	52	108	61	50
Ac. Aspart.	149	67	93	73	106
Asparagine	185	74	85	71	108
Sérine	90	67	132	86,5	124
Glycocolle	128	126	79	138	150,5
Ac. Glutam.	92	124	118	123	167
Glutamine	98	97,5	120	121	136,5
Thréonine	91	58,2	90,5	51	93
Alanine	69,5	102	109,5	68	132
Ac. γ Am. But.	69	81,5	71,2	118	110
Proline	98,5	260	79,5	279	77,3
Ac. α Am. But.	162	125	282	162	158
Valine	166	100	119	85,5	121
Méthionine	57	90	136,5	59,7	134
Iso-leucine	198	88	81	68,5	129,6
Leucine	170	72,5	111,6	73,5	191
Phényl-ala.	120	93,4	95,2	79,2	141
Tryptoph.	115	65,5	61	47	91

L'iso-leucine et la leucine augmentent fortement chez les mutants, et la leucine s'accumule chez M_7 . Par contre, chez M_4 et M_6 où celle-ci est réduite, la teneur en proline s'accroît considérablement.

Enfin, contrairement aux plants normaux, les mutants présentent, en lumière atténuée, une augmentation de teneur en glutamine et une réduction de teneur en asparagine.

3°) Sucres libres

Les teneurs en sucres (glucose et fructose) diminuent chez les Témoins, mais augmentent dans le cas des Mutants, non pas par amélioration de la photosynthèse, semble-t-il, mais plutôt par le ralentissement plus prononcé de leur utilisation (Tableau XXXVIII (HT)). Dans le cas du Mutant M_6 , le ribose ne se phosphoryle même plus, pour l'incorporation dans les nucléo-protéines. Dans le cas de M_5 où le ribose n'augmente pas en lumière atténuée, s'il y a amélioration de l'efficacité de la photosynthèse, ce ne peut être par accroissement de teneur des pigments : c'est donc seulement une meilleure édification du complexe chromoprotéique fonctionnel qui pourrait permettre ce progrès.

DISCUSSION SUR LA PREMIERE PARTIE

Dans cette première partie du travail, diverses relations sont apparues entre les groupes métaboliques étudiés chez les plantes normales et mutées.

A partir des résultats numériques précédemment obtenus, chez l'Orge et l'Arabidopsis, nous allons dresser un rapide bilan des relations qui ont été vérifiées statistiquement, en rapportant brièvement le résultat principal et quelques exceptions relevées.

Ainsi, nous étudierons, successivement, les relations entre les composés suivants :

- 1 - chlorophylles (a) et (b)
- 2 - chlorophylles et caroténoïdes
- 3 - chlorophylles et sucres
- 4 - chlorophylles et amino-acides
- 5 - amino-acides et amides
- 6 - amino-acides et caroténoïdes

1°) Rapports entre chlorophylles (a) et (b)

Chez l'Orge, un échantillon de 20 couples de mesures (Témoins et Mutants en conditions normales et lumière atténuée) répartis en 5 classes nous a donné les résultats suivants en coordonnées naturelles :

- coefficient de corrélation : $\rho = + 0,975$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F < 1$; $F_{5\%} = 3,29$)
- droite de régression : $[\text{chl.}(b)] = 0,61 [\text{chl.}(a)]^{5\%}$

Ce résultat est illustré par la figure (37). Les points s'écartant le plus de la courbe sont les suivants :

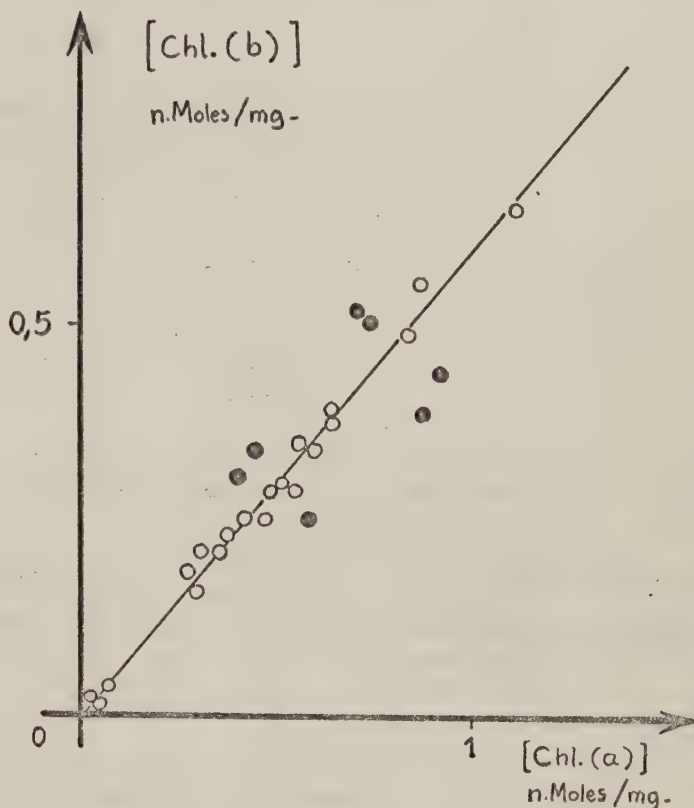
...

a) avec excès de chlorophylle (a) : Témoins et V_1 à 3000 lux et haute température, et V_3 à basse température.

b) avec un excès de chlorophylle (b) : Témoins et V_1 en lumière atténuée prolongée et V_1 et V_2 à basse température.

Les exceptions mentionnées en noir sur le schéma (fig. 16) sont cependant assez peu éloignées de la courbe générale

Fig. (16) - Relation entre chlorophylles (a) et (b) chez l'Orge : Témoins et Mutants. Les points figurés en noir représentent les cas les plus éloignés de la courbe (§ a) et b) ci-dessus)



Chez l'Arabidopsis, nous n'avons pas défini d'équation générale : chez les plants normaux, le rapport chl.(a)/chl.(b) est en moyenne de 2,03, alors que chez les Mutants, il atteint 3,7 à 3,9.

En conclusion, le rapport entre chlorophylles chez les Mutants et dans diverses conditions physiologiques est plus homogène chez l'Orge que chez l'Arabidopsis.

2°) Rapports entre caroténoïdes et chlorophylles

Ces deux groupes métaboliques sont en relation directe. A titre indicatif, nous rapportons, ici, la relation établie entre caroténoïdes totaux et chlorophylle (a) :

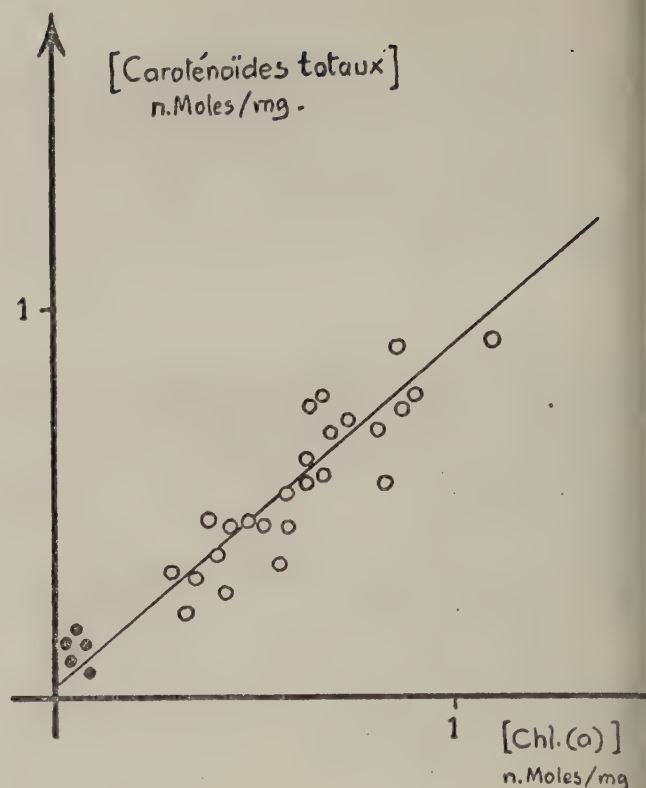
Sur un échantillon de 30 couples et 6 classes :

- le coefficient de corrélation est : $\rho = 0,805$
- le test de linéarité est positif au seuil 5 % $F_c = 1,78$, $F_{5\%} = 2,78$
- la droite de régression est :

$$[\text{caroténoïdes}] = 0,784 [\text{chl. (a)}] + 0,065$$

L'allure générale de la courbe est donnée par la figure (17). Remarquons que les Mutants $M_4 - M_5 - M_6 - M_7$ (indiqués en noir sur la figure) s'inscrivent bien à la base de la courbe générale, bien que n'ayant pas été comptés dans l'échantillon : leur métabolisme, à ce point de vue, reste équilibré quoique ralenti à l'extrême.

Fig. (17) - Relation entre la chlorophylle (a) et les caroténoïdes totaux chez l'Orge



Cette relation est d'autant mieux vérifiée, que les plants sont jeunes. Les travaux relatifs à l'*Arabidopsis* ont montré (fig. 15-16) qu'après le stade de la montée des hampes florales, les courbes donnant les variations de teneurs en chlorophylles et caroténoïdes au cours du développement sont décalées.

3°) Relation entre chlorophylles et sucres

Chez l'Orge, le meilleur résultat concerne le lien entre la teneur en glucose et celle en chlorophylle (a). La courbe directe présente une allure exponentielle (fig. 39-①). Le calcul statistique a porté sur la courbe donnant $y = \log. [\text{glucose}]$ en fonction de $x = [\text{chl. (a)}]$.

Sur un échantillon de 30 couples (en 5 classes), nous avons obtenu :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,892$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F = 1,36$, $F_{5\%} = 2,99$)
- droite de régression : $\log. [\text{glucose}] = 1,28 [\text{chl. (a)}] + 0,08$

Chez l'*Arabidopsis*, le nuage de points ne traduit aucune relation apparente entre sucres et chlorophylles.

En conclusion, l'Orge est une plante à production de sucre importante puisque la concentration en glucose augmente exponentiellement en fonction des teneurs croissantes en chlorophylle (a). Ce caractère montre une tendance vers les formes (extrêmes), comme la canne à sucre.

Un cas particulier d'exception est cependant à noter : les plantes cultivées à basse température présentent une teneur en glucose trop faible en regard de leur contenu en chlorophylle (a).

Il apparaît, ainsi, un aspect spécifique de l'action du froid sur le métabolisme.

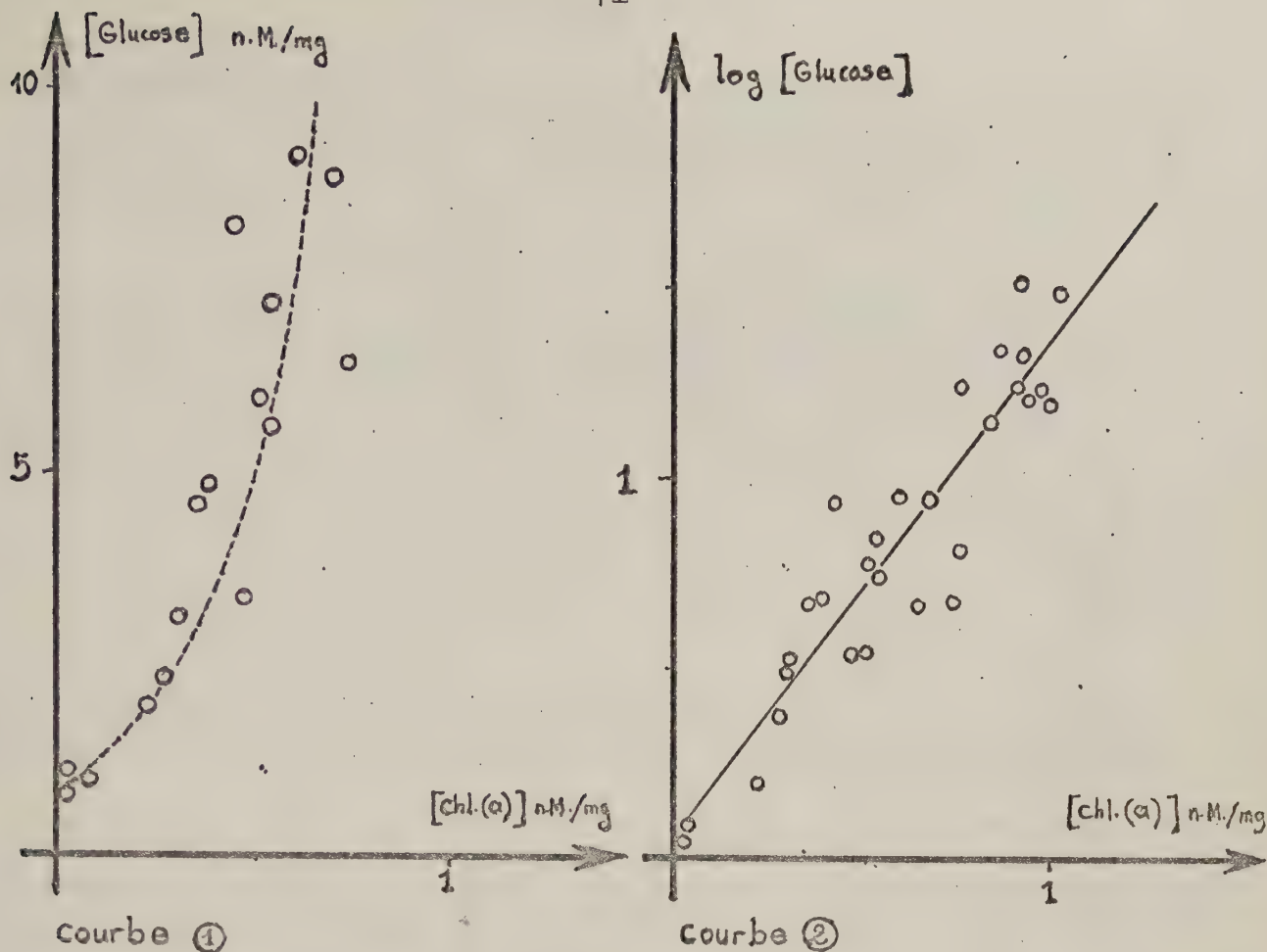


Fig. (18) - Relation entre teneur en glucose et teneur en chlorophylle (a) chez l'Orge : courbe (1) en coordonnées naturelles et courbe (2) en coordonnées semi-logarithmiques.

4°) Relations entre Amino-acides et Chlorophylles

Chez l'Orge et l'Arabidopsis, un certain nombre d'acides aminés varient en sens inverse des concentrations en chlorophylles.

Parmi ces amino-acides, nous retrouvons presque constamment :

Iso-leucine
leucine
valine
phényl-alanine
tryptophane
lysine
histidine
acide aspartique
asparagine
acide glutamique
glutamine

Nous avons étudié les variations de cette somme en fonction des teneurs en chlorophylles (a) et (b).

a) Relation entre amino-acides et chlorophylle (a)

Chez l'Orge, la courbe présente, en coordonnées directes, une allure hyperbolique confirmée par le tracé des variations en fonction de l'inverse de la concentration en chlorophylle (a).

...

Dans ces conditions, un échantillon de 17 couples répartis en 4 classes nous a donné :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,756$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F_{0,84}$, $F_{5\%} = 3,81$)
- droite de régression : $[\text{amino-acides}] = 2,76 [\text{chl.}(a)]^{-1} + 1,1$

La figure (19) illustre ces variations.

Chez l'Arabidopsis, cette relation de proportionnalité ne s'est pas vérifiée et la courbe n'a pu être ramenée à une droite que par le biais des coordonnées semi-logarithmiques : dans ces conditions, un échantillon de 7 couples de mesures nous a donné un coefficient de corrélation : $\rho = -0,921$ et une droite de régression de pente - 22,37.

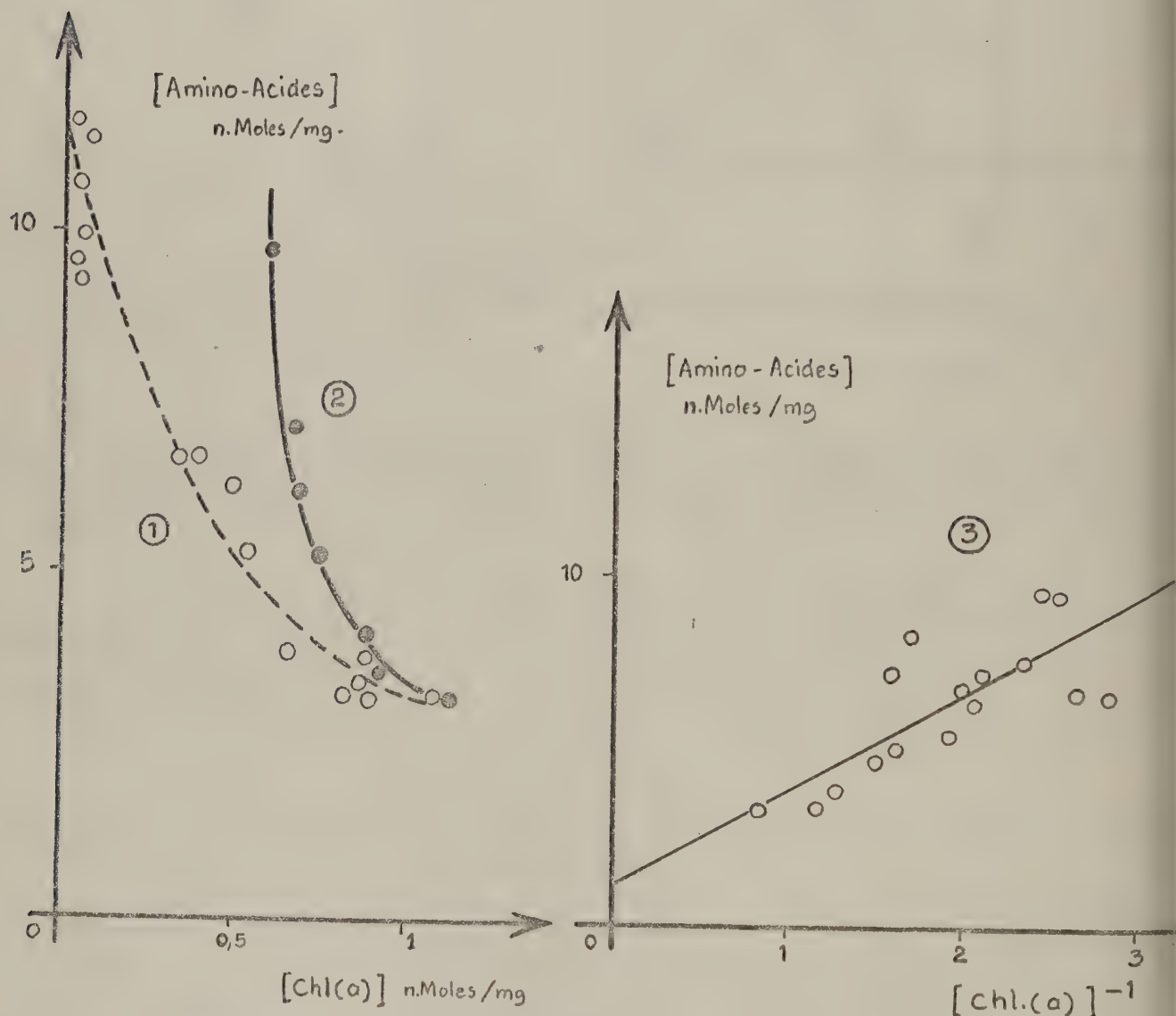


Fig. (19) - Relations entre amino-acides et chlorophylle (a) chez l'Orge et l'Arabidopsis

- | | |
|---|-----------------------------|
| courbe 1 : chez l'Orge | } en coordonnées naturelles |
| courbe 2 : chez l'Arabidopsis | |
| courbe 3 : chez l'Orge : Relation inverse | |

Il est à noter qu'en coordonnées naturelles, les courbes de l'Orge et de l'Arabidopsis se rejoignent vers les fortes teneurs en chlorophylle (a).

Chez l'Orge, la relation ne coïncide pas avec la courbe générale dans deux cas : les plants Témoins et Viridis en lumière atténuée de courte durée et en lumière atténuée prolongée où les teneurs en amino-acides sont respectivement inférieures et supérieures aux valeurs théoriques.

En conclusion, la décroissance des teneurs en amino-acides en fonction des teneurs croissantes en chlorophylles ne suit pas la même cinétique chez l'Orge et chez l'Arabidopsis : cette décroissance est plus rapide chez l'Arabidopsis, ce qui semble correspondre effectivement au cycle de vie plus court de cette dernière plante.

b) Relation entre amino-acides et chlorophylle (b)

Le lien paraît différent dans le cas de la chlorophylle (b) où le nuage de points, commun cette fois à l'Orge et à l'Arabidopsis traduit une proportionnalité inverse simple.

Un échantillon de 24 couples de mesures répartis en 5 classes a donné les résultats suivants :

- coefficient de corrélation : $\rho = - 0,938$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F = 1,448$, $F_{5\%} = 3,13$)
- droite de régression : $[\text{amino-acides}] = - 13,8 [\text{chl. (b)}] + 10,33$

La figure (20) illustre ce mécanisme qui paraît plus rudimentaire pour la chlorophylle (b) que pour la chlorophylle (a), malgré le lien général linéaire entre ces deux formes. Il apparaît, ainsi, une spécificité de l'influence de la chlorophylle (a) dans le cas de la relation la plus rapide avec les teneurs en amino-acides.

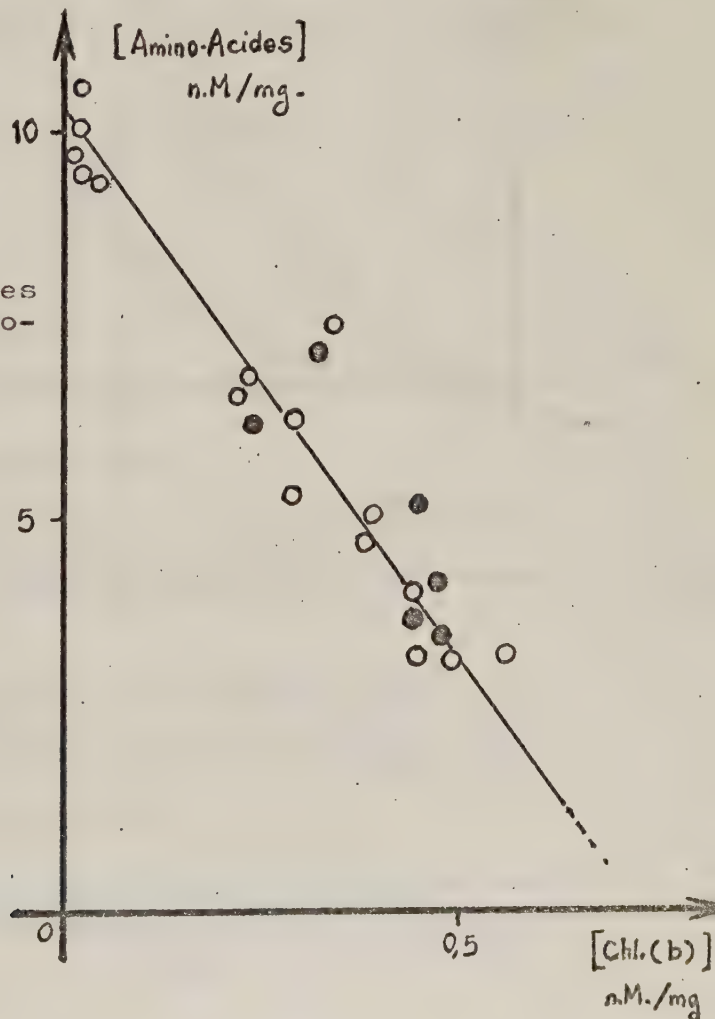


Fig. (20) - Relation entre teneur en amino-acides et teneur en chlorophylle (b) : chez l'Orge (O) et chez l'Arabidopsis (●)

5°) Relation entre amino-acides et amides

Il s'est avéré que les amides, et plus particulièrement l'asparagine, sont spécialement abondantes dans les mutants. Nous avons voulu rechercher si leur teneur était liée de façon définie aux concentrations en amino-acides. Nous avons rapporté, ici, d'une part la relation entre l'asparagine et les dix autres amino-acides liés aux chlorophylles et, d'autre part, les relations entre acide aspartique et asparagine.

a) Relation entre amino-acides et asparagine

Chez l'Orge, un échantillon de 17 couples répartis en 7 classes nous a donné les résultats suivants :

- en coordonnées naturelles, la courbe présente une allure logarithmique
- en coordonnées semi-logarithmiques ($\log \text{Asp-NH}_2 \times 10$), la courbe prend l'allure d'une droite :
- coefficient de corrélation : $\rho = 0,948$
- test de linéarité : positif aux seuils $< 1\%$
($F = 4,60$, $F_{1\%} = 4,56$, $F_{1\%} = 7,57$)
- droite de régression : $\log ([\text{Asp-NH}_2] \times 10) = 0,131 [\text{Am. Acides}] + 0,1$

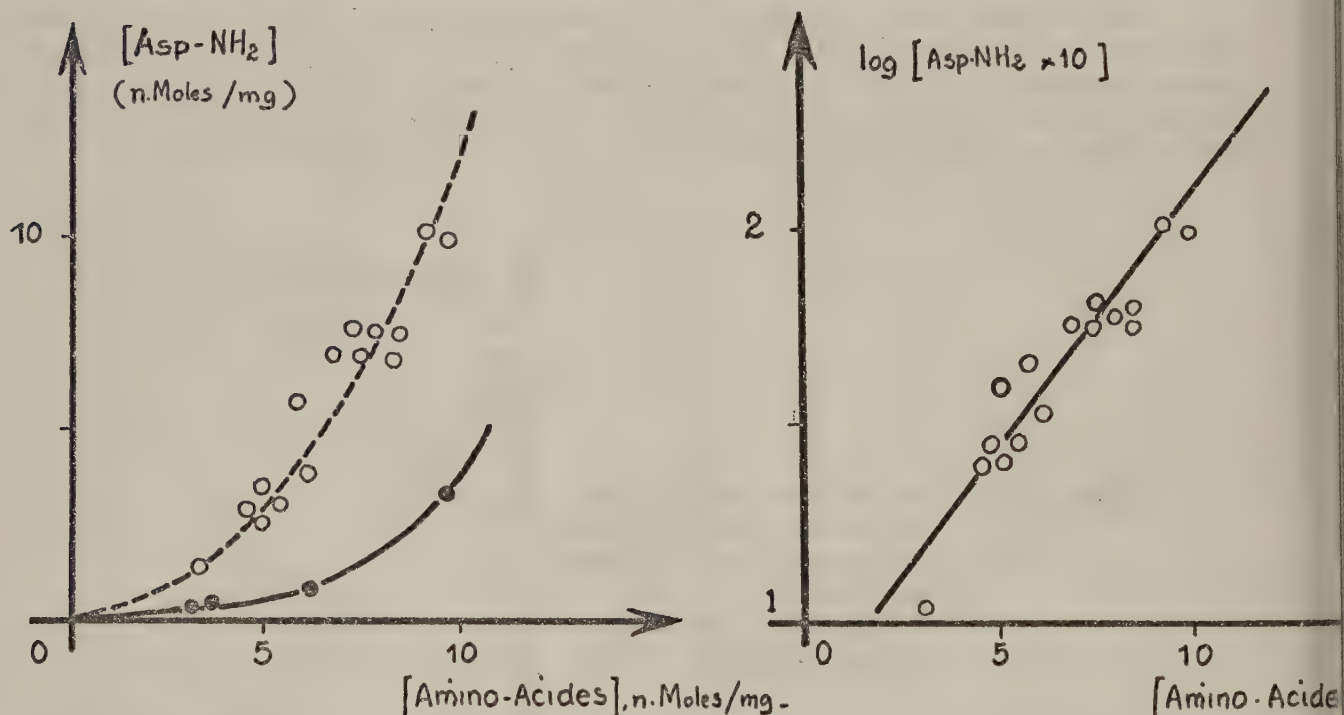


Fig.(21) - Relation entre l'asparagine et les autres amino-acides "chlorophylle-dépendants" (coordonnées naturelles et semi-logarithmiques) chez l'Orge (-O--) et l'Arabidopsis (-●-)

Chez l'Arabidopsis, la nature de la relation est la même que chez l'Orge, mais les concentrations en asparagine sont plus faibles. Dans un échantillon de 4 couples de mesures où $\rho = 0,99$, l'équation de la droite de régression est :

$$\log [\text{Asp-NH}_2] \times 10 = 0,148 [\text{Amino-acides}]$$

La droite passe par l'origine, mais la pente est, cependant, voisine de celle observée chez l'Orge, ce qui traduit la grande parenté des deux mécanismes.

b) Relation entre acide aspartique et asparagine

Chez l'Orge, nous avons observé une division du nuage de points en deux groupes principaux : le premier comprend les plants Témoins, les Mutants "Viridis" au stade 8 jours, en lumière atténuée et après ablation de la feuille cotylédonaire. Le second groupe comprend essentiellement : les Mutants "Viridis" au stade 12 jours, en lumière atténuée prolongée, à basse température, ainsi que les Témoins sous température et lumière élevées.

Pour le premier groupe, sur un échantillon de 20 couples de mesures répartis en 4 classes, nous avons obtenu :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,913$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F_c = 1,45$, $F_{5\%} = 3,63$)
- droite de régression : $[\text{ASP-NH}_2] = 3,47 [\text{Asp.}] \mp 0,2$

Pour le deuxième groupe, sur un échantillon de 20 couples répartis en 5 classes, nous avons obtenu :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,88$
- test de linéarité : positif seulement au seuil 1 ‰
($F_c = 6,97$, $F_{1\text{‰}} = 9,34$)
- droite de régression : $[\text{Asp-NH}_2] = 9,46 [\text{Asp.}] + 0,3$

Ces résultats sont consignés sur la figure (43).

Chez l'Arabidopsis, nous avons disposé de 6 couples de mesures nous donnant les résultats suivants (fig. (22-3)) :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,987$
- droite de régression : $[\text{Asp-NH}_2] = 3,53 [\text{Asp.}]$

Le mécanisme chez l'Arabidopsis correspond donc à celui du premier groupe chez l'Orge.

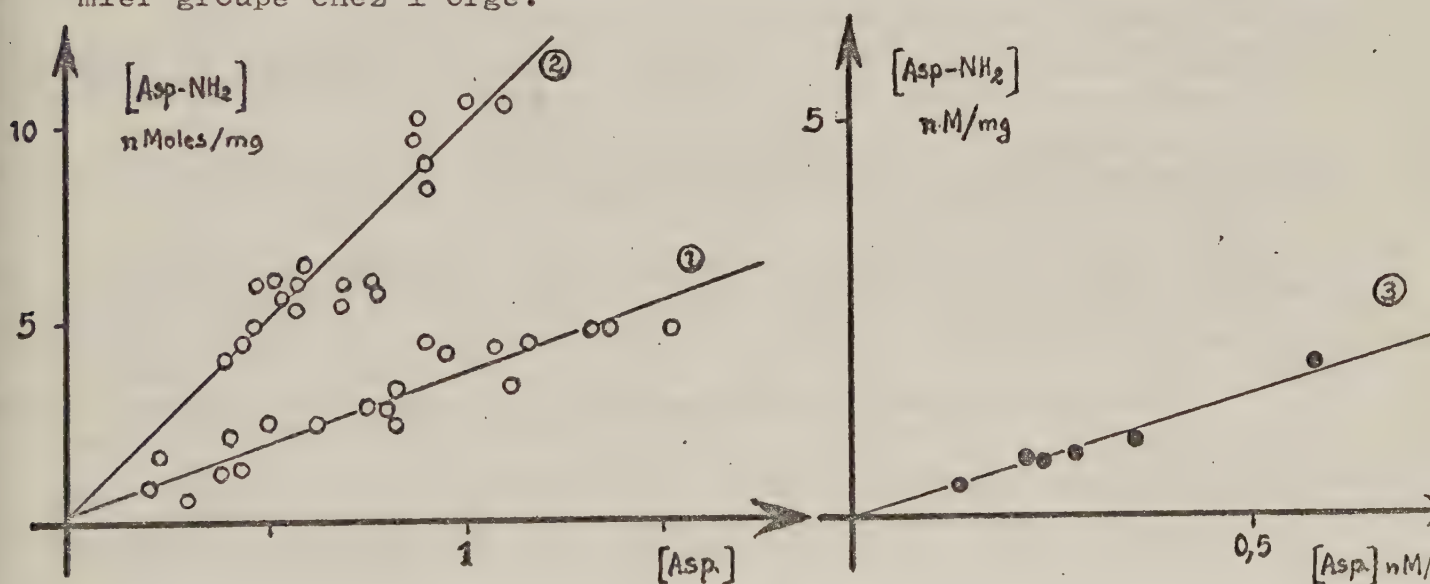


Fig. (22) - Relation entre acide aspartique et asparagine :

chez l'Orge : droite 1 : 1er groupe
droite 2 : 2ème groupe

Chez l'Arabidopsis : droite 3

En conclusion, ces résultats permettent de distinguer certaines conditions physiologiques accentuant la formation d'asparagine.

De même, il apparaît que les Mutants jeunes (8 jours) s'apparentent encore à la catégorie des plants normaux (1er groupe).

Ces relations montrent que l'asparagine est directement associée aux amino-acides sensibles aux chlorophylles, et plus particulièrement à son précurseur : l'acide aspartique.

La recherche d'une relation particulière entre chlorophylles et asparagine s'est alors imposée, mais le calcul a montré que la corrélation entre ces deux paramètres n'est pas significativement distincte de zéro. C'est donc bien par l'intermédiaire des autres amino-acides qu'il faut considérer le lien entre les pigments et l'amide aspartique.

6°) Relations entre amino-acides et caroténoïdes

C'est le cas de la L. leucine qui a le plus retenu notre attention, du fait de sa participation maintenant connue (sinon analysée dans le mécanisme) à la biosynthèse des caroténoïdes. Nous allons rapporter ici, successivement, les relations établies entre la leucine et le carotène, la lutéine et les dérivés oxydes (violaxanthine + Néo-xanthine) respectivement. Ces expériences ont nécessité un nombre de mesures assez important et nous nous sommes limités de ce fait, à l'Orge, car chez l'Arabidopsis, le nombre de cas différents de conditions était relativement plus faible.

a) Relation entre Leucine et β Carotène

Le nuage de points évoque une décroissance hyperbolique, mais la courbe est apparemment double : deux groupes de relations peuvent être, en effet, distingués.

- le premier groupe comporte les plants normaux, les Mutants jeunes, les plants témoins et V_1 sous forte température et éclaircissement intense, les Témoins et V_3 en lumière atténuée.
- sur un échantillon de 20 couples de mesures répartis en 5 classes nous avons obtenu, à partir des inverses : $[\text{leu}]^{-1} = f([\text{carotène}])$
- coefficient de corrélation : $\rho = 0,830$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F_c = 0,47$, $F_{5\%} = 3,59$)
- droite de régression : $[\text{leucine}]^{-1} \approx 26,8 [\text{carotène}]$
- le deuxième groupe comprend les Mutants viridis âgés (à partir de 12 jours) et en lumière atténuée (sauf V_3), à basse température, et les Mutants M_4 à M_7 .

Sur un échantillon de 18 couples de mesures répartis en 5 classes, nous avons obtenu à partir des coordonnées semi-inversées :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,850$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F_c = 1,24$, $F_{5\%} = 3,41$)
- droite de régression : $[\text{leucine}]^{-1} = 32,36 [\text{carotène}] + 2,13$

Deux points sont communs à ces deux courbes qui se rejoignent en coordonnées naturelles pour les fortes concentrations en carotène : T et V_1 sous forte lumière et température (fig. 23)

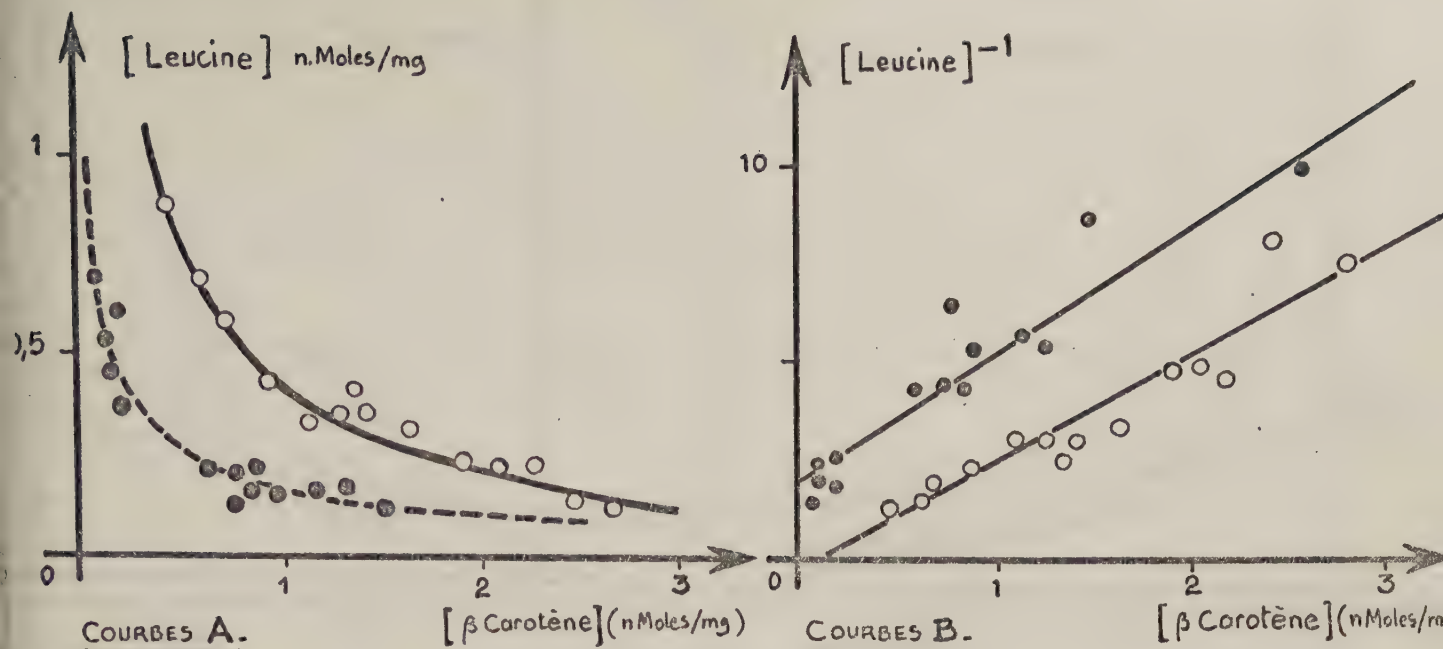


Fig. (23) - Relations entre leucine et β carotène en coordonnées naturelles (courbes A) et semi-inversées (courbes B) chez l'Orge.
1er groupe : (-O-) et 2ème groupe (---●---)

En ce qui concerne le classement des plants Témoins et V_1 placés sous forte lumière et température, le doute subsiste pour le Témoin, mais V_1 peut se classer dans le groupe 2.

b) Relations entre leucine et (viola-xanthine + néo-xanthine)

Nous avons retrouvé, à nouveau, les deux groupes de relations constitués des mêmes éléments que dans le cas du carotène.

Pour le groupe 1, un échantillon de 15 couples de mesures réparties en quatre classes nous a fourni les résultats suivants en coordonnées semi-inversées :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,815$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F_c = 3,31$, $F_{5\%} = 3,98$)
- droite de régression : $[\text{leucine}]^{-1} \simeq 13,1 [V + \text{Néo-xanthines}] + 0,94$

Pour le groupe 2, un échantillon de 17 couples de mesures répartis en cinq classes nous a donné en coordonnées semi-inversées :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,962$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F_c = 1,47$, $F_{5\%} = 3,49$)
- droite de régression : $[\text{leucine}]^{-1} \simeq 42,6 [\text{xanthines}]$

Nous avons, ainsi, obtenu les mêmes types de relations que pour le carotène, mais, dans ce cas, il existe une plus grande différence de pente entre les deux groupes.

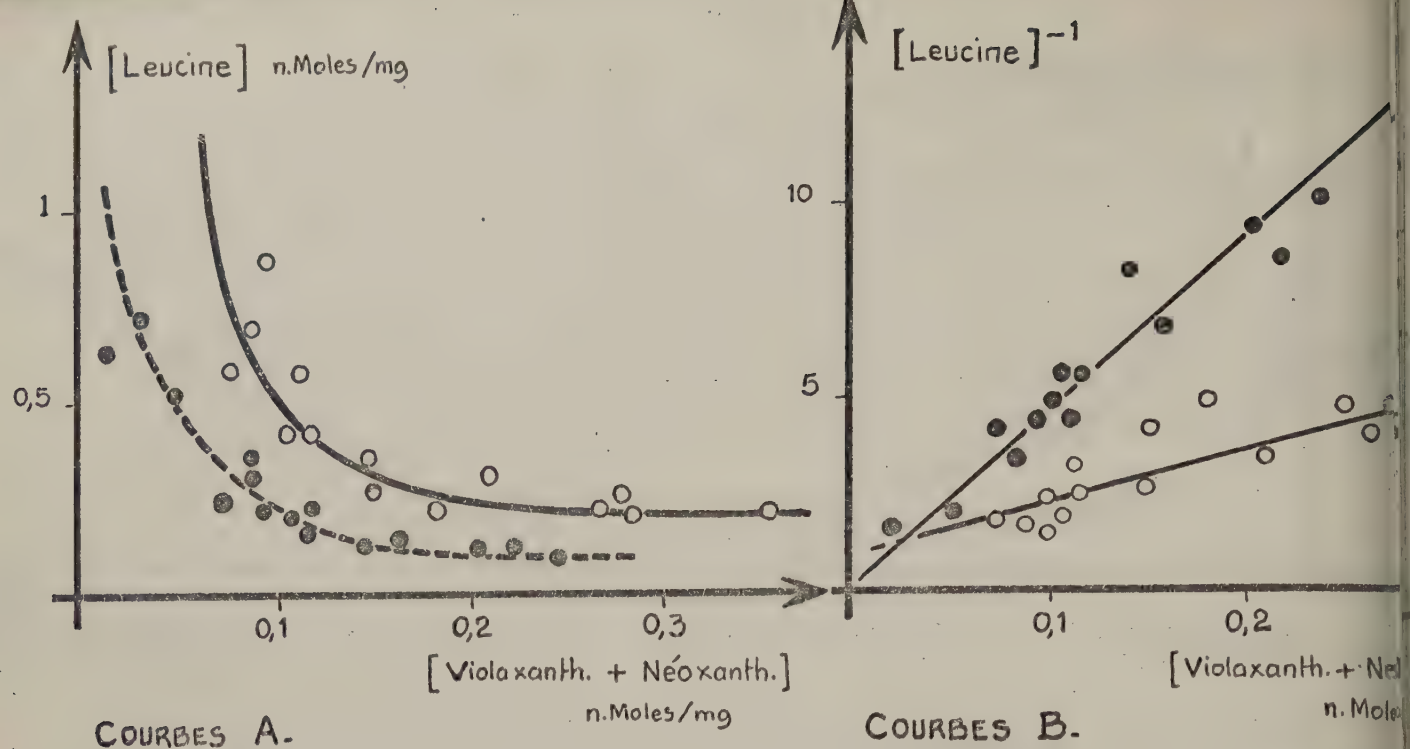


Fig. (24) - Relations entre leucine et (viola-xanthine + néo-xanthine) chez l'Orge, en coordonnées naturelles (A) et semi inversées (B)

1er groupe : (○) - 2ème groupe : (●)

c) Relations entre leucine et lutéine

La lutéine nous a encore permis de retrouver les deux groupes de variations, mais, cette fois, avec une particularité concernant le second.

Le premier groupe montre, à nouveau, une décroissance de type hyperbolique. Après transformation en coordonnées semi inversées, un échantillon de 15 couples de mesures répartis en quatre classes nous a donné les résultats suivants :

- coefficient de corrélation : $\rho = 0,744$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F_c = 1,067$, $F_{5\%} = 3,98$)
- droite de régression : $[\text{leucine}] = 14,17 [\text{lutéine}] + 0,25$

Le deuxième groupe présente dans le cas de la lutéine, une décroissance linéaire, ce qui le différencie des cas précédents.

Sur un échantillon de 13 couples de mesures répartis en quatre classes, nous avons obtenu :

- coefficient de corrélation : $\rho = - 0,925$
- test de linéarité : positif au seuil 5 % ($F_c = 0,924$, $F_{5\%} = 4,26$)
- droite de régression : $[\text{leucine}] = -2,72 [\text{lutéine}] + 0,75$

Les résultats sont explicités sur la figure (25-B)

Il apparaît, ainsi une nette différence dans le mécanisme reliant la leucine à la lutéine entre les deux groupes précédemment définis. Il est à remarquer que la droite (2ème groupe) est pratiquement tangente à l'hyperbole (1er groupe) pour les valeurs médianes des teneurs en lutéine ou leucine. C'est dans les cas de valeurs extrêmes (inférieures et supérieures) que les différences sont les plus marquées.

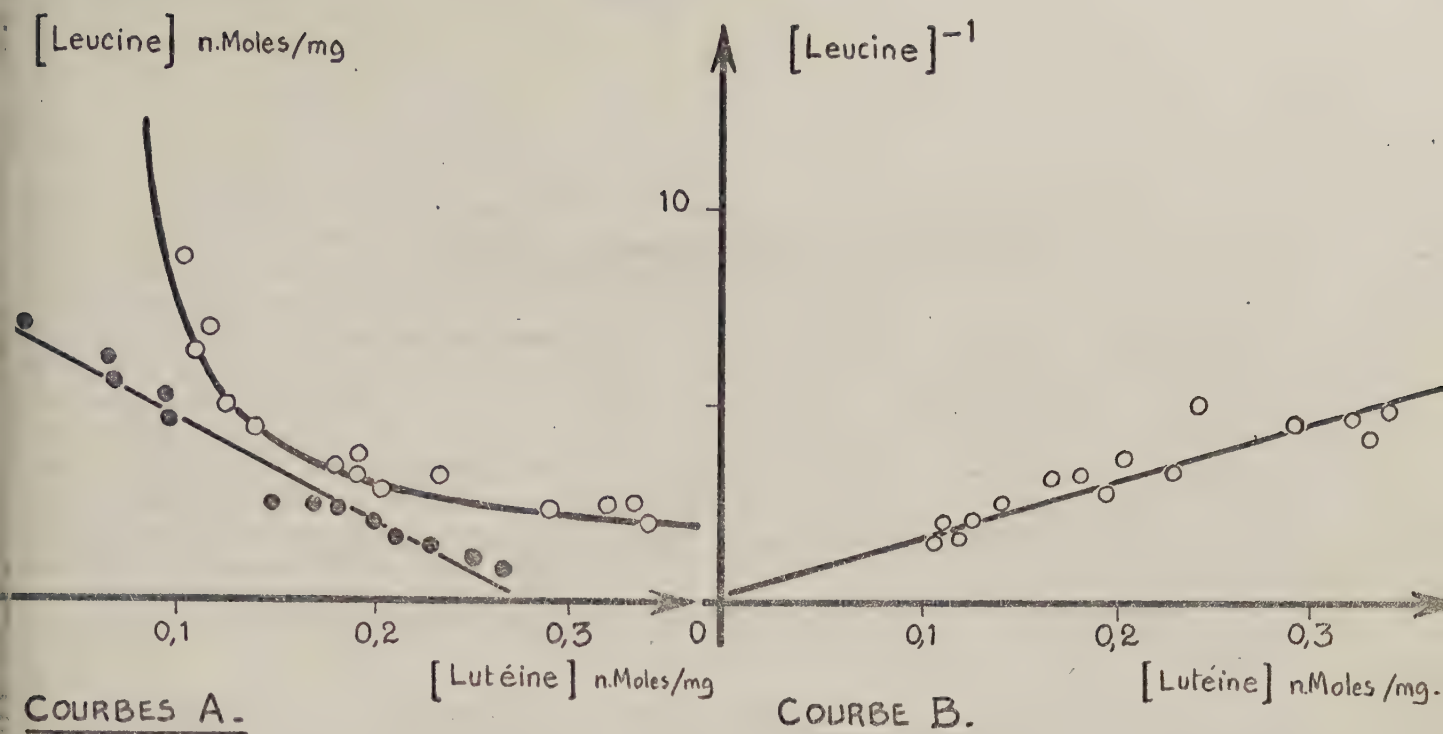


Fig. (25) - Relations particulières entre la leucine et la lutéine chez l'Orge, en coordonnées naturelles (A) et semi inversées (B) - Groupe 1 (-O-) et groupe 2 (-●-).

Ces résultats montrent que les effets des mutations viridis ainsi que de certains traitements physiologiques (lumière atténuée, basse température) peuvent se traduire par des modifications électives de la dynamique de certaines relations métaboliques. Dans le cas des relations avec la leucine, la lutéine offre une particularité par rapport aux autres caroténoïdes.

Comme nous le constaterons fréquemment par la suite, les mutations (viridis principalement) se traduisent plutôt par des modifications de la dynamique des réactions physiologiques que par des variations qualitatives au niveau des composants métaboliques.

Toutes ces observations, portant sur un bilan de l'ensemble des résultats déjà obtenus, nous ont permis de dessiner l'allure générale des relations entre les principaux groupes métaboliques. Il existe heureusement des exceptions, et ce sont celles-là qui permettront quelquefois de déceler les phénomènes métaboliques les plus intéressants (chapitres suivants).

Les relations ainsi définies, bien qu'ayant surtout à priori une valeur statistique, doivent correspondre à des cinétiques de réactions biochimiques ainsi qu'au nombre et à la répartition des divers précurseurs et dérivés métaboliques des composants que nous avons étudiés. Leur examen de détail, élément par élément, pourrait permettre, dans le cadre d'un travail ultérieur, de découvrir de nouvelles formes de liaisons entre des métabolites aux inter-relations encore mal connues.

La classification des effets biochimiques des mutations ou d'autres traitements physiologiques pourrait, alors, être effectuée en fonction de la coïncidence ou des écarts par rapport aux lois générales ainsi établies. Un réseau très précis de caractéristiques et de critères d'analyse se dégagerait et fournirait de plus, des renseignements biochimiques d'après le sens des écarts par rapport aux relations normales.

L'une des principales caractéristiques de nos mutants chlorophylliens est l'accumulation d'asparagine, mais pas de glutamine. Cette accumulation n'est cependant pas toujours proportionnelle à la réduction des teneurs en pigments, comme si une partie des chlorophylles n'était pas active (212) : il s'agit peut-être de la fraction qui se dégrade en phéophytine par atténuation de lumière. Il est ainsi permis de penser qu'une partie seulement de la chlorophylle présente dans les chloroplastes, participe réellement à la vie physiologique de la plante : celle qui est fixée sur le complexe chromoprotéique. La fraction résiduelle libre serait alors plus fragile (non protégée par l'édifice chromoprotéique, et peut-être plus précisément par les caroténoïdes qu'il contient) et c'est justement cette partie qui se dégraderait en phéophytine lors des chocs lumineux par atténuation. Une extraction différentielle des pigments libres et des pigments liés serait alors à étudier avec précision.

La comparaison du métabolisme de l'Orge et de l'*Arabidopsis* montre que la dynamique biochimique est à l'échelle de celle du cycle végétal : l'Orge, plante annuelle et de forte taille, réagit plus lentement qu'*Arabidopsis* de très faible taille, mais à croissance rapide et dont les enzymes (phosphatases) nécessitent, à poids égal d'extrait, une quantité de substrat 20 fois plus faible pour atteindre leur V_M mais agissent 10 fois plus vite, aux stades où nous avons opéré. De même, les amino-acides de l'Orge réagissent plus lentement que les chlorophylles à l'atténuation de lumière.

Les expériences sur *Arabidopsis* ont confirmé la formation abondante de dérivés phosphorylés de plastoquinones en lumière atténuée, mais les conditions d'obtention doivent être déterminées de façon extrêmement précise ; elles n'ont pas encore pu être établies chez l'Orge.

Enfin, les expériences d'atténuation de lumière ont mis en évidence le rôle du plasto-chroménol (phosphorylable) comme forme d'attente ou de réserve : son accumulation, quand les conditions extérieures sont mauvaises (froid, obscurité) traduit, vraisemblablement, chez les plants normaux, un ralentissement de la phosphorylation. La même observation chez les Mutants en conditions normales traduit un trouble permanent à ce niveau, avec très certainement, un défaut d'ATP en fin de chaîne.

Au niveau des amino-acides libres, nous retiendrons particulièrement, que l'accumulation de leucine et iso-leucine en lumière atténuée est plus importante et plus rapide que celle des autres amino-acides libres, ce qui plaide en faveur de leur participation dans une structure protéique étroitement associée à la photosynthèse et pouvant être photo-induite et dégradée à l'obscurité.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous allons approfondir quelques aspects physiologiques du mécanisme des mutations, en particulier sur les Mutants d'Orge de type "*Viridis*", de façon à faire apparaître certaines propriétés biochimiques plus caractéristiques des divers Mutants. De nouvelles relations établies entre les divers métabolites étudiés permettront d'aborder, dans la troisième partie, l'étude d'un mécanisme plus général intervenant dans la régulation du fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LE MECANISME DE QUELQUES TROUBLES METABOLIQUES DECELES CHEZ LES MUTANTS

- Chapitre I - Etude de quelques phénomènes de reverdissement
chez l'Orge
- Chapitre II - Etude comparée de l'incorporation d'acétate- $l-^{14}C$
dans les plants d'Orge normaux et "viridis"
- Chapitre III - Recherches préliminaires sur la localisation
cellulaires de quelques phénomènes métaboliques
- Chapitre IV - Etudes physiologiques à l'aide d'inhibiteurs
spécifiques du métabolisme chez les plantes
normales et mutées

CHAPITRE I

ETUDE DE QUELQUES PHENOMENES DE REVERDISSEMENT CHEZ L'ORGE

- A - Pouvoir de reverdissement du mutant V_1
à température élevée
- B - Pouvoir de reverdissement des 3 mutants
"viridis" après étiolement à l'obscurité
totale
 - 1° Reverdissement après étiolement
de courte durée
 - 2° Reverdissement après étiolement
prolongé

A - POUVOIR DE REVERDISSEMENT DU MUTANT VIRIDIS V_1 A TEMPERATURE ELEVÉE - APRES ETIOLEMENT AU FROID

Dans la première partie de ce travail, nous avons vérifié que la température présente un effet assez marqué sur le métabolisme, quoique de façon différente, - voire opposée - chez les plants normaux par rapport aux mutés.

Après exposition à basse température, 8 jours à 15°C, nous avons replacé les cultures à 26° C sous un éclairage assez fort (3000 lux) : au bout de 2 à 3 jours, les Mutants V_1 ont présenté un aspect très semblable à celui des plants normaux, et les analyses ont confirmé cette observation.

1°) Pigments et cofacteurs

Le mutant V_1 ne présente plus de différences significatives de teneurs en chlorophylles et caroténoïdes par rapport aux Témoins : les résultats sont identiques à 2,5 % près (Tableau XXXIX (HT)). Au niveau des cofacteurs, il reste une quantité importante de plastochroménol, suite à l'étiolement au froid, mais les teneurs chez V_1 sont identiques à celles des témoins à 3 % près (Tableau XL (HT))¹.

2°) Amino-acides libres

Les teneurs en amino-acides du mutant V_1 , initialement supérieures à celles des témoins, sont maintenant toutes ramenées à un niveau identique ou parfois légèrement plus bas, signe d'une reprise de la synthèse protéique normale accompagnant le reverdissement (Tableau XLI (HT)).

3°) Sucres libres

Les teneurs en glucose, fructose et ribose ne sont pas significativement différentes chez les témoins et Chez V_1 . Seul le saccharose reste un peu plus concentré chez le mutant (tableau XLII (HT)).

En conclusion, il a suffi d'un facteur physique simple pour restaurer l'appareil photosynthétique chez le mutant le plus viable. Nous verrons qu'un tel résultat ne pourra être obtenu, dans le cas des mutations plus prononcées V_2 et V_3 , qu'avec un apport chimique délicat à établir. Enfin, rappelons que les mutants létaux de type Xantha et Albina ne peuvent généralement survivre que par greffage ou par l'apport de milieux nutritifs très complexes, ce qui constitue une progression dans la difficulté d'obtenir une amélioration de la photosynthèse chez des mutants chlorophylliens de moins en moins fertiles, c'est-à-dire dans l'ordre : Viridis → Xantha → Albina.

B - POUVOIR DE REVERDISSEMENT DES MUTANTS VIRIDIS APRES ETIOLEMENT A L'OBSCURITE TOTALE

Les phénomènes biochimiques accompagnant l'étiollement ont été très étudiés (186)(218) et traduisent un comportement de régression du système pigmentaire.

Nous avons voulu aborder la question sous l'angle inverse en examinant les possibilités de retour au système différencié à partir d'organes étiolés à divers degrés. Deux exemples sont mentionnés ici, montrant que le reverdissement après étiollement à des degrés croissants peut comporter des réactions biochimiques très particulières selon le stade initial étiolé. La comparaison des Mutants est faite par rapport aux témoins placés dans les mêmes conditions qui représentent le mécanisme de référence.

1°) Reverdissement après étiollement de courte durée

Les lots de plants ont été maintenus 4,5 jours à l'obscurité totale à 20°C, puis placés 2,5 jours à 24°C sous forte lumière (3000 lux).

a) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Au cours du reverdissement après étiollement court, les plants normaux ont plus de difficultés que les mutants à rétablir leurs teneurs pigmentaires. Leur teneur totale (y compris avec la phéophytine) reste très inférieure à celles des mutants (de 55 à 80 % pour les chlorophylles). Seule la néo-xanthine (forme la plus polaire des hydroxy-caroténoïdes) est plus abondante chez les témoins (Tableau XLIII (HT)).

Au niveau des cofacteurs, les mutants manifestent une certaine richesse en tocophéryl-chroménol, V_1 et V_3 contiennent plus de plastochroménol et moins de chroménol-forme-2 que les témoins (Tableau XLIV (HT)).

b) Amino-acides libres

Les concentrations en amino-acides libres, excepté l'asparagine, sont faibles dans tous les cas. La synthèse protéique semble donc très active, à la fois chez les témoins et les mutants ; les écarts de concentrations en amino-acides entre mutants et témoins sont bien plus faibles qu'avant étiollement (Tableau XLV (HT)).

...

c) sucres libres

Les sucres sont plus abondants chez les mutants, dont l'équipement photosynthétique est, d'ailleurs, plus important. Le ribose est ici plus concentré qu'il ne l'a jamais été au cours des diverses expériences précédentes (Tableau XLVI (HT)).

En définitive, les mutants paraissent mieux supporter l'étiollement court que les plants normaux, comme c'était également le cas lors de traitements tels que le froid. Leur système chloroplastique étant généralement moins bien différencié que celui des normaux, il régresse peut-être moins vite lors de l'étiollement et présente ensuite moins de difficultés pour remonter au niveau normal. Le prolongement de la durée d'étiollement a donc été nécessaire pour faire apparaître des phénomènes nouveaux.

2°) Reverdissement après étiollement prolongé

Dans les mêmes conditions que précédemment, l'étiollement a été étendu à 7 jours, puis le reverdissement effectué pendant 5 jours sous une lumière forte.

Morphologie des plantes :

Les dimensions des plantes (qui ont atteint 19 jours) sont les suivantes :

	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
C (mm)	190	160	192	203
F(1) (mm)	223	247	158	256

Les courbes de croissance ont toutes marqué un temps d'arrêt pendant le séjour à l'obscurité et sont remontées lors de la mise à la lumière. Ceci explique que le développement des plants ne soit pas plus avancé à cet âge.

a) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Alors que les témoins et les mutants V₁ reverdissent bien, V₂ et V₃ révèlent un défaut dans leur système pigmentaire : leurs témoins en chlorophylles restent faibles alors que s'accumule une grande quantité de phéophytine. Plus importante est la baisse de teneur en lutéine, viola-xanthine et néo-xanthine qui font place à l'apparition d'un nouveau pigment qui n'est pas décelé dans les autres extraits (Tableau XLVII (HT)).

Les propriétés spectrales de ce composé, tout comme son comportement chromatographique, sont très proches de celles de la lutéine

Tableau (31) - Comparaison du spectre de la lutéine et de celui de la xanthophylle nouvelle apparue chez V₂ et V₃

Composés	λ maxima			λ minima	
Xanthoph.					
Nouvelle	418,5	441	469	423 $\pm$ 1	457
Lutéine	417,5	440	468	422	457

La superposition des spectres confirme l'extrême parenté de ces deux produits qui sont très certainement de proches dérivés (de la xanthophylle)

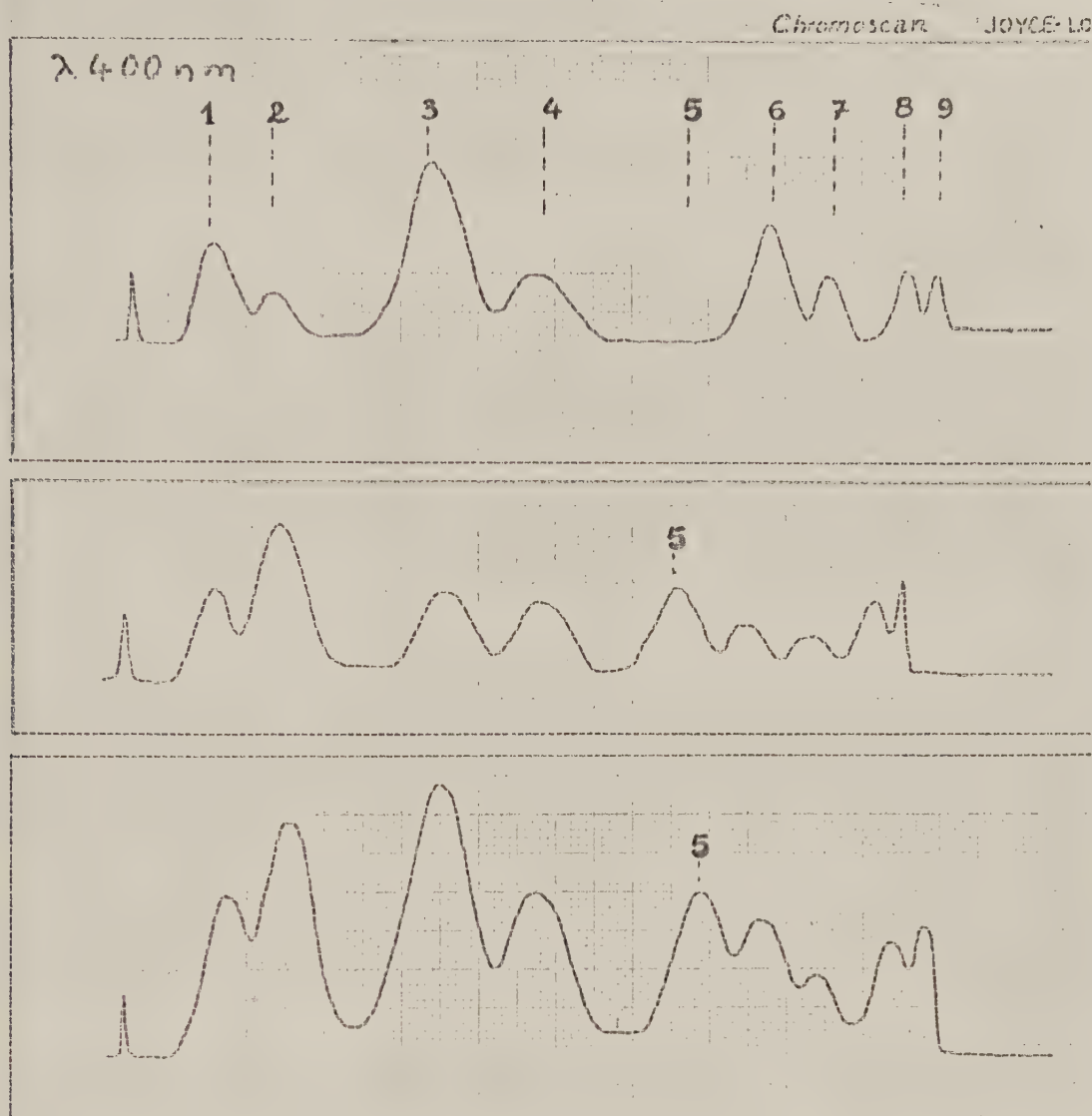


Fig. (26) - Enregistrements à 400 nm de chromatogrammes montrant la localisation chromatographique du caroténoïdes néo-formé chez V_2 et V_3 .

Légende :

1 = β carotène	4 = chlor. (b)	7 = viola-xanthine
2 = phéophytine	5 = xanthophylle	8 = néo-xanthine
3 = chlor. (a)	nouvelle	9 = chlorophylli-
	6 = "lutéine" classique	des + tannins

Au niveau des cofacteurs, par comparaison avec l'étiollement court, les divers chroménols s'accumulent (Tableau XLVIII (HT)). Cependant, en valeurs relatives à celles des plants normaux, les formes tocophéryl-chroménol et dérivés diminuent dans V_2 et V_3 au profit de la forme plasto-chroménol. Celle-ci semble donc liée une fois de plus à des conditions physiologiques peu actives ou peu fonctionnelles.

b) Amino-acides libres

De nombreux amino-acides, en particulier les basiques, suivent très bien la relation en sens inverse des teneurs en chlorophylles (Tableau XLIX (HT)). L'asparagine, de même, augmente dans le sens de l'affaiblissement de la photosynthèse. Parmi les cas inverses, où la relation n'est pas vérifiée, l'un des plus intéressants concerne celui de la leucine et l'iso-leucine qui sont en teneurs plus réduites dans V_2 et V_3 . En ce cas-là, leur incorporation dans les pigments supplémentaires pourrait contribuer à fournir une explication du phénomène.

c) Sucres libres

Les sucres ne présentent guère de réactions particulières interprétables. Le ribose augmente progressivement des témoins à V_3 (Tableau L (HT)).

Les diverses réactions métaboliques rencontrées jusqu'ici tendraient à montrer que le système pigmentaire est très sensible aux traitements physiologiques ; viennent ensuite les amino-acides et enfin les sucres qui paraissent constituer la catégorie métabolique la plus difficile à faire évoluer.

CHAPITRE II

ETUDE COMPAREE DE L'INCORPORATION D'ACETATE-1-¹⁴C DANS LES PLANTS D'ORGE NORMAUX ET VIRIDIS

- A - Etude des pigments chlorophylliens
- B - Etude des cofacteurs
- C - Etude des amino-acides libres
- D - Etude des sucres libres

Tous les métabolites que nous avons pu identifier dans les plantes normales se retrouvent également chez les mutants "Viridis". Cependant, il est permis de penser que certaines réactions peuvent se produire avec des cinétiques différentes, voire même des ordres différents.

Nous avons donc analysé la cinétique d'incorporation de l'acétate-1-¹⁴C dans les pigments, les cofacteurs, les sucres libres et les amino-acides libres des plants d'Orge normaux et "Viridis".

CONDITIONS EXPERIMENTALES (Radiochimie)

La solution diluée d'acétate-1-¹⁴C (*) que nous avons mise à la disposition des plantes contenait 3 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^3$ à raison de 170 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$;

Les plants normaux et mutés, groupés chacun en trois séries de deux plants ont eu à leur disposition un tube avec 0,8 ml pour deux plants, ce qui correspond sensiblement à 7 $\mu\text{Ci}/\text{g}$ de poids frais.

L'extrémité supérieure de la feuille cotylédonnaire a été incisée et courbée jusqu'à tremper dans la solution (à partir du temps zéro).

...

(*) Produit C. E. A. Réf. CMM4

Durée de contact : les feuilles ont trempé 5 heures dont 4 à l'obscurité et une à la lumière afin d'intensifier le métabolisme. La première extraction est alors effectuée (temps 5H) suivie de deux autres espacées de 5 en 5 H, les feuilles étant sorties de la solution depuis la première extraction (8 H du matin).

Les pigments, cofacteurs, sucres et amino-acides libres ont été analysés aux temps 5-10-15 H, puis leur activité spécifique déterminée par la microtechnique d'autoradiographie quantitative.

Les plantes ont été cultivées sous 19 H de jour et un éclairage de 3000 lux depuis la germination jusqu'aux extractions finales.

Nous indiquerons, successivement, les résultats d'analyse biochimique, puis les activités spécifiques correspondantes et nous discuterons enfin la signification des résultats.

Les volumes absorbés par les plantes pendant 5 H n'ont pu être mesurés, car ils étaient généralement inférieurs à 1 μ l.

A - ETUDE DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS

Les résultats des dosages biochimiques, (indiqués dans le tableau L1 (HT)), montrent que les variations du contenu des pigments au cours de la "journée" d'analyse (8H - 13 H - 18H) ne sont pas très importantes et correspondent assez bien aux données classiques sur ces variations (en jours longs) (216)(aetb).

Les activités spécifiques montrent quelques particularités du métabolisme des divers pigments dans les plants normaux et mutés.

Tableau (32) - Activités spécifiques de quelques pigments exprimées en 10^{-15} curies/nM, en fonction du temps, chez les plants d'Orge normaux et mutés.
(ordre respectif : 5H - 10H - 15H de haut en bas)

Pigments	t	Témoins	V_1	V_2	V_3
Chlor. (a)	5 H	62,7	10,26	4,5	0,97
	10 H	34,6	7,27	4,73	5,74
	15 H	3,0	2,54	12,8	10,0
Chlor. (b)	5 H	10,16	6,86	1,38	0,677
	10 H	+	3,37	8,75	2,13
	15 H	0	0	1,54	0
Carotène	5 H	168,6	96,5	101,6	56,8
	10 H	59,8	61,4	43,7	21,5
	15 H	32,4	32,6	41,2	56

- a) l'incorporation de ^{14}C diminue en quantité depuis les témoins en passant à $V_1 - V_2 - V_3$
- b) la chlorophylle (b) est nettement moins marquée que la chlorophylle (a) ; le composé le plus actif est le β carotène.
- c) chez les plants normaux et V_1 , la chlorophylle (a) est plus marquée au temps 5 H, puis le marquage diminue (la décroissance du marquage de la molécule par l'acétate- ^{14}C serait plus rapide que celle déterminée par SIRONVAL sur le soja) tandis que pendant le même temps, l'incorporation suit une courbe ascendante chez V_2 et V_3 , traduisant une synthèse beaucoup plus lente. Par²contre, le marquage de la chlorophylle (b), de même cinétique que pour la chlorophylle (a) chez V_1 et les témoins semble passer par un maximum au temps 10 H chez V_2 et V_3 , ce qui montre que la relation de biosynthèse entre²chlorophylles pourrait être modifiée chez ces deux derniers mutants (fig. 27)

Le marquage du carotène remonte au temps 15 H chez le mutant V_3 , ce qui suggère la formation d'une réserve de substance provenant de l'acétate et susceptible d'alimenter à nouveau le métabolisme avec un temps de retard (231).

B - ETUDE DES COFACTEURS

Au cours de la journée, la teneur en tocophéryl-chroménol passe par un maximum au temps 10 H de même que les formes 2 et 3, alors que le plasto-chroménol varie en sens inverse chez V_1 et les plants normaux, et augmente constamment chez V_2 et V_3 . La plastoquinone A s'accumule elle aussi au cours de la journée.

Les tableaux 33 et 34 indiquent, maintenant, les variations d'activité spécifique des composés dosés et d'activité relative de quelques autres.

Après la pQ. A. dont le marquage décroît à partir du temps 5 H, le chroménol forme 2 est surtout marqué chez les témoins, tandis que le tocophéryl-chroménol se marque très lentement chez les mutants, malgré sa teneur élevée, ce qui traduit une mauvaise utilisation. Une activité importante a été décelée au niveau de la pQ.B qui n'a pas été dosée en raison de sa très faible teneur, (de même que la pQ.C.) Les valeurs sont données ci-après en % de la radio-activité totale.

Les composés les plus marqués sont des acides gras et des glycérides que nous n'avons pas identifiés ici. Une remarque s'impose cependant : la radio-activité de la pQ.B est très importante par rapport aux autres. Or celle-ci comporte une estérification par l'acide palmitique dont TREMOLIERES, 1971 (231) a nettement démontré qu'il incorporait très rapidement l'acétate- ^{14}C dans les chloroplastes, ce qui explique notre résultat. La même explication pourrait s'appliquer à la forme 2 de chroménol, forme reliée à la synthèse des quinones-phosphates dont la principale comporte aussi la chaîne palmitique. (expériences sur Arabidopsis). Chez les mutants, le marquage est plus important seulement pour la pQ.B.

En définitive, les mutants se caractérisent principalement par une lenteur de la synthèse des chlorophylles et du plasto-chroménol et quelques variations selon des cinétiques particulières, chez V_2 et V_3 pour le carotène, la pQ.A. et le chroménol-2.

...

Tableau (33) - Activité spécifique de quelques cofacteurs aux temps 5-10-15 H exprimées en : 10^{-15} Ci/nM

Composés	t	Témoins	V_1	V_2	V_3
Tocophéryl-chroménol	5 H	22	0	0	0
	10 H	20	0	0	0
	15 H	2,37	2,2	10,5	5,9
Chroménol-2	5 H	174	53,2	50,4	48,3
	10 H	16	13	25	13
	15 H	24	11	53,8	41,3
Chroménol-3	5 H	23	0	0	0
	10 H	0	0	0	0
	15 H	0	0	0	0
Plasto-quinones A	5 H	518	-	256	-
	10 H	273	124	151,3	207
	15 H	122	86	247	69

Tableau (34) - Expression de la radio-activité de quelques plastoquinones en % de la radio-activité totale de la fraction étherée

Composés	t	Témoins	V_1	V_2	V_3
p. Q. A.	5 H	0,015	-	0,023	-
	10 H	0,033	0,025	0,023	0,0277
	15 H	0,030	0,044	0,029	0,034
p. Q. B.	5 H	0,132	0,196	0,214	0,254
	10 H	0,120	0,145	0,158	0,567
	15 H	0,120	0,124	0,138	0,138
p. Q. C.	5 H	0,023	0,020	0,024	0,033
	10 H	0,023	0,020	0,032	0,020
	15 H	0,043	0,025	0,047	0,028

Amino Acides	Témoins			V ₁			V ₂			V ₃		
	5 H	10 H	15 H	5 H	10 H	15 H	5 H	10 H	15 H	5 H	10 H	15 H
Ornithine	1,5	1,0	2,42	1,1	1,02	1,95	1,1	0,76	3,03	2,0	0,76	2,47
Lysine	3,5	2,44	5,3	2,67	5,30	3,55	2,86	1,91	6,5	1,88	2,1	2,25
Histidine	3,0	5,07	9,1	2,0	4,81	1,8	1,42	1,27	2,84	0,65	0,92	1,6
Arginine	19,1	6,86	++	7,87	10	++	4,9	11,8	3,72	5,6	6,13	1,80
Ac. Aspart.	134,6	26,45	16,5	44	32,4	13,2	25	14,8	22	15,77	15,01	14,3
Asp-NH ₂	6,8	5,7	4,4	3,0	6,78	5,4	3,9	6,77	10,0	3,03	8,9	5,86
Sérine	5	3,2	6,78	2,63	4,5	2,84	1,42	0,82	5,61	3,00	5,4	4,92
Glycocolle	12,5	4,0	3,16	10,4	6,3	4,67	1,59	4,0	6,03	4,07	4,5	6,14
Ac. Glutam.	53,6	27,1	17,63	81,7	53,8	21,33	32,8	32,9	43,7	38,4	28,9	23,03
Glutamine	140	33,7	48,5	115	53,6	43,5	150	84	66	82	63	80
Thréonine	1,26	0,83	1,86	0,41	0,55	0,91	0,516	0,80	0,46	0,59	0,52	0,44
Alanine	12,85	2,41	4,3	14,22	3,74	4,26	8,65	3,28	6,64	11,1	3,34	6,3
Ac. β -Ar. But.	100	21,0	14,9	85,3	24,2	15,9	41	19,0	26,0	52,5	21,8	22,4
Ac. α -Ar. But.	383	0	1,27	143,7	23,9	2,54	397,2	28,1	24	298,6	6,8	13,6
Valine	18,2	2,58	0,93	3,54	0,72	0,41	1,71	0,44	1,2	2,44	0,75	1,3
Iso-leucine	0,96	1,23	3,33	0,467	0,67	0,51	0	0,41	0,37	0	0,15	1,37
Leucine	15,4	1,82	12,5	16,17	1,59	2,1	22,23	3,67	13,2	15,77	7,4	12,45
Phényl-al.	0,47	3,0	0,81	3,31	1,6	1,8	2,41	0	2,08	3,01	4,36	0
Tryptoph.	0,4	11	1,64	1,7	0,88	0	0,26	1,23	0,35	0	1,10	0

Tableau (35) - Activité spécifique des amino-acides libres aux temps 5 H, 10 H, 15 H après incorporation d'acétate-1-¹⁴C chez l'Orge (témoins et mutants viridis)

C - AMINO-ACIDES LIBRES

Les analyses biochimiques aux temps 5H - 10H - 15H figurent dans les tableaux LIII, LIV et LV (HT)

Le tableau (35) donne maintenant les variations d'activité spécifique des amino-acides en fonction du temps.

L'examen de ces résultats appelle un certain nombre de remarques : parmi les amino-acides contenus par les plants normaux en quantités abondantes, l'acide aspartique, la glutamine, l'acide glutamique et le γ amino-butyrique figurent comme les plus marqués. Leur radio-activité est, d'ailleurs, en décroissance après 5H, ce qui traduit une incorporation rapide. Viennent ensuite, la valine, la leucine, l'arginine et le glycocolle, avec le même type de cinétique.

Toujours, chez les plants normaux, les amides suivent la même cinétique que les acides correspondants, mais l'asparagine est bien moins marquée que l'acide aspartique, alors que la glutamine dépasse largement l'acide glutamique.

L'iso-leucine se marque plus lentement, et, nettement moins que la leucine et la valine : son marquage rappelle celui de la thymine.

Chez les mutants, l'asparagine se marque plus lentement que l'acide aspartique qui présente, lui-même, une courbe plus aplatie, dans le temps, que celle des témoins. Cela traduit un ralentissement métabolique qui apparaît également avec beaucoup de netteté pour le glycocolle chez V_2 et V_3 (fig. 28)

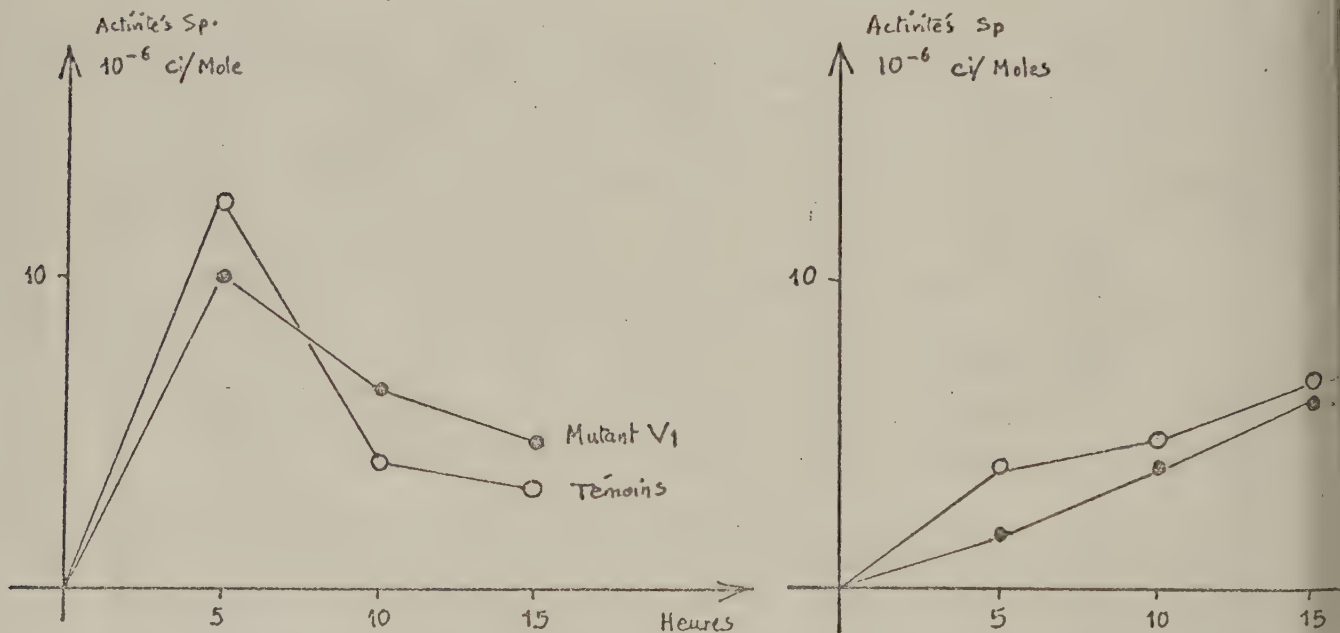


Fig. (28) - Cinétiques comparées d'incorporation du ^{14}C de l'acétate dans le glycocolle des plants normaux et mutés.

Sachant que le glycocolle est un précurseur de la biosynthèse des chlorophylles, ces courbes évoquent de façon très logique les cinétiques de marquage des chlorophylles (a) en particulier (tableau 32). Par sa concentration, le glycocolle n'est pas un facteur limitant, mais c'est son utilisation qui est ralentie chez les mutants V_2 et V_3 . L'accumulation d'acides aminés déclenchée par la lumière atténuée pourrait cependant avoir un effet favorable sur la synthèse

chlorophyllienne de certains mutants en jouant sur le déplacement des équilibres de réactions.

La valine et l'iso-leucine sont moins marquées chez les mutants, de même que le tryptophane : le ralentissement de la vitesse de biosynthèse de ce dernier pourrait correspondre, chez les mutants, à une diminution d'A. I. A., hormone de croissance.

Signalons cependant, que certaines cinétiques donnent à penser que les marquages les plus importants, dans les cas de cinétiques rapides, peuvent se produire au bout de 2 à 3 heures seulement. La portée de l'interprétation des résultats est donc limitée par le nombre de points de mesures dans le temps.

D - ETUDE DES SUCRES

Le niveau très élevé des teneurs en sucres doit certainement être attribué au mode de culture (depuis l'origine sous 3000 lux, 19 H sur 24) joint à l'âge des plants (7 jours). Nous n'avons indiqué que la moyenne des valeurs obtenues au cours de la journée, car les fluctuations - assez faible - sont affectées, dans ce cas, d'une incertitude plus importante que celles des mesures de radio-activité. (Tableau LVI (HT)).

Les activités spécifiques au cours du temps sont indiquées ci-dessous :

Tableau (36) - Cinétique comparée d'incorporation du ^{14}C de l'acétate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ dans les sucres principaux des plants d'Orge normaux et mutés (10^{-6} Ci/M)

Sucres	t	Témoins	V_1	V_2	V_3
Glucose	5 H	0,41	0,39	0,46	0,33
	10 H	0,60	0,65	1,0	0,76
	15 H	0,65	0,77	0,94	1,57
Fructose	5 H	1,58	1,62	2,03	5,13
	10 H	1,72	2,02	2,4	4,18
	15 H	1,40	1,81	1,58	3,3

Le marquage plus rapide du fructose traduit l'ordre de biosynthèse à partir du "pool" acétyl-Co A en remontant la voie de EMBDEN-MEYERHOFF.

Le marquage est plus important chez les mutants, ce qui montre que cette voie de synthèse doit y être plus importante que chez les plants sains. Ce résultat avait déjà été pressenti dans la lère partie, car il paraissait normal que les mutants compensent une insuffisance de photo-synthèse de leurs sucres par d'autres voies, à partir de métabolites déjà présents, ou de réserve.

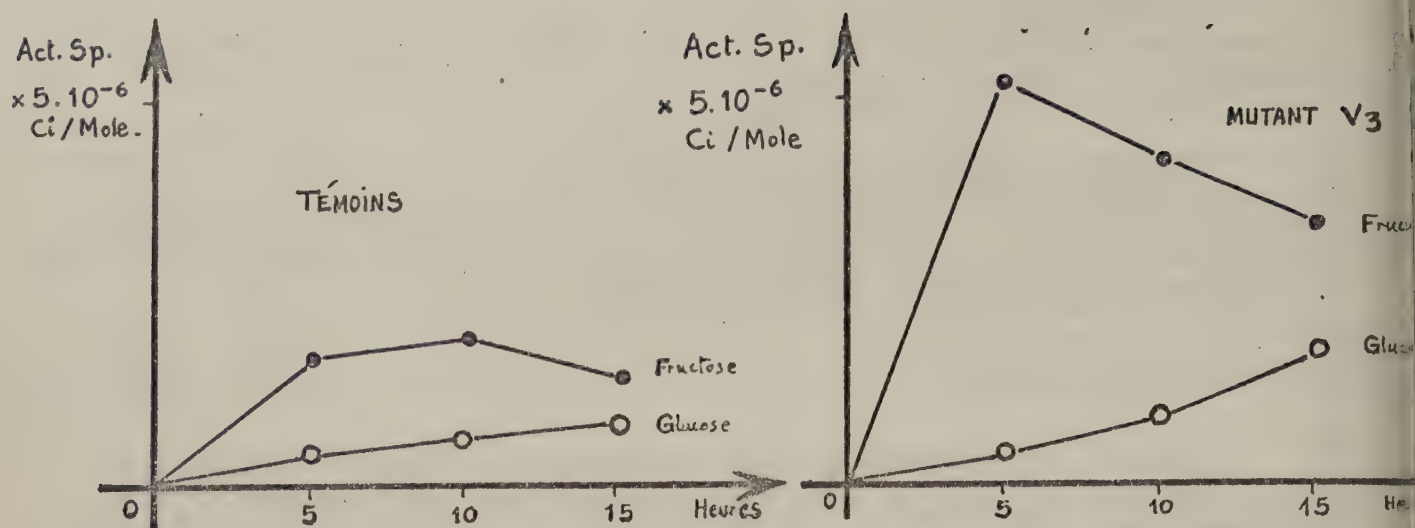


Fig. (29) - Comparaison de l'incorporation dans ^{14}C (acétate- ^{14}C) dans le glucose et le fructose des plants normaux et du mutant V_3

-O- glucose
-●- fructose

Le saccharose se marque également, mais les résultats sont moins précis du fait de la faiblesse des teneurs accrue par le rendement après passage sur les résines successives. Néanmoins, le saccharose de V_2 et V_3 est fortement marqué au temps 15 H avec $6,8$ et $9,6.10^{-6}$ Ci/ M^2 respectivement ; il est très faible aux temps précédents.

En définitive, le ralentissement du métabolisme des chlorophylles ainsi que de nombreux amino-acides est plus marqué chez les mutants présentant la moins bonne fertilité (V_2 et V_3). L'asparagine y est relativement inerte ainsi que les mutants V_1 par voie photosynthétique, mais chez V_2 et V_3 , les sucres libres (glucose et fructose) sont plutôt obtenus par une synthèse de compensation "en retour" depuis l'acétyl coenzyme A, certainement.

Le classement dans l'ordre $V_1 - V_2 - V_3$ du degré d'atteinte du métabolisme des mutants, parfois apparemment démenti par les teneurs en pigments chlorophylliens, se trouve confirmé par l'étude des cinétiques de l'incorporation du ^{14}C de l'acétate dans ces pigments. Cela montre la difficulté du classement des mutations chlorophylliennes d'après les critères d'aspect et de pigmentation.

Les mutants ne sont pas tant caractérisés par des modifications qualitatives de leur équipement biochimique, mais que par la dynamique des réactions métaboliques qui trahit mieux leurs altérations.

CHAPITRE III

RECHERCHES PRELIMINAIRES SUR LA LOCALISATION DE QUELQUES SITES METABOLIQUES AU NIVEAU DE LA CELLULE ET DU CHLOROPLASTE

A - Localisation histochimique de quelques métabolites chez l'Orge et Tradescantia

- 1° Aperçu morphologique
- 2° Phosphatases et ATP^{ases}
- 3° Sucres
- 4° Amino-acides

B - Etude biochimique comparée des amino- acides libres dans les chloroplastes et le cytoplasme isolés et purifiés chez Tradescantia

- 1° Conditions expérimentales
- 2° Résultats biochimiques
- 3° Interprétation des résultats

Les résultats déjà obtenus dans les premières phases de ce travail ont montré de nombreuses réactions métaboliques associées plus ou moins directement à la photosynthèse et aux mutations chlorophylliennes.

Le chloroplaste, siège de l'équipement photosynthétique, doit donc être assez éloigné du cytoplasme au point de vue des réactions biochimiques. Relativement peu de travaux ayant été effectués sur ce sujet (3)(163)(250), il nous a paru d'autant plus important d'effectuer quelques vérifications à ce niveau, que nos analyses sont en général effectuées sur l'ensemble des cellules et non sur les chloroplastes isolés.

Ce chapitre nous conduira à étudier, d'abord, la localisation cellulaire de quelques groupes métaboliques : sucres et amino-acides, ainsi que des enzymes qui nous intéressent : phosphatases et ATPases. Nous étudierons ensuite le métabolisme des amino-acides libres comparativement au niveau des chloroplastes et des éléments du cytoplasme isolés et purifiés à partir de cellules de Tradescantia, matériel très favorable à gros chloroplastes et fournissant constamment des feuilles vertes homogènes.

A - LOCALISATION HISTOCHIMIQUE DE QUELQUES METABOLITES (Planches photographiques)

1° Aperçu morphologique

Des coupes de feuilles d'Orge (normaux et mutés) ont été colorées à l'hématoxyline-érythrosine (sur formol postchromé).

En lumière normale, les chloroplastes sont plaqués le long des parois chloroplastiques, surtout dans l'épiderme et le parenchyme. Ils sont très rares au niveau des vaisseaux, bois et liber. Trois types de chloroplastes peuvent être distingués : les plus nombreux (54 %) sont de petite taille, fortement colorés ; d'autres, de taille moyenne, encore abondants (33 %) sont moins colorés ; enfin, 13 % sont très gros et colorés : on en retrouve au voisinage des vaisseaux d'où les autres types sont absents. Ils présentent parfois une zone péri-chloroplastique importante.

En lumière atténuée, les chloroplastes se répartissent mieux dans les cellules et sont plus abondants au centre qu'en lumière normale. De nombreuses expansions péri-chloroplastiques sont visibles, évoquant des échanges chloroplaste-cytoplasme. Les mutants V_3 présentent de telles protrusions et des signes d'altération plus particulièrement dans les gros chloroplastes.

Les mutants V_1 comptent respectivement 49 % de petits chloroplastes, 46 % de moyens et 5 % de gros ; les mutants V_2 en ont 42 % de petits, 53 % de moyens et 5 % de gros ; les mutants V_3 en ont 46 % de petits et 46 % de moyens et 8 % de gros. Les mutations réduisent un peu le nombre des petits chloroplastes au profit des moyens. Le nombre moyen de chloroplastes par cellule est le suivant : Témoins 11, V_1 : 10, V_2 : 12, V_3 : 17

Ces diverses estimations donnent un aperçu des différences entre mutants et témoins, différences assez minimes au premier abord.

2° Phosphatases et ATP^{ases}

L'étude a été effectuée sur des plants cultivés en lumière normale et après traitement en lumière atténuée.

a) Phosphatase alcaline -

En lumière normale, l'activité est surtout chloroplastique (90 à 95 % de l'activité totale), elle est très forte dans les petits chloroplastes et dans quelques-uns des plus gros qui montrent fréquemment un grain important à auréole réfringente. Dans la zone du liber ces gros chloroplastes présentent des granulations internes très nettes ainsi que sur la coque péri-chloroplastique (Planche IX (HT)).

En lumière atténuée, l'activité est très forte et un peu moins localisée comme si une diffusion intervenait alors. Des grains sont encore visibles dans certains gros chloroplastes.

Les mutants V_1 présentent un aspect très voisin de celui des témoins, mais les mutants V_2 ont une activité enzymatique plus forte, sans différence de localisation appréciable.

Les mutants V_3 sont un peu plus faiblement actifs que les normaux, avec peu de gros chloroplastes, quelques chloroplastes petits et moyens actifs le long des parois, et quelques moyens (avec parfois des granulations sans réfringence) dans la zone périvasculaire.

b) ATP^{ase} alcaline L'activité est essentiellement chloroplastique en lumière normale et un peu cytoplasmique au niveau péri-vasculaire, en lumière atténuée. En lumière normale, l'activité se situe surtout dans les petits chloroplastes ; elle est plus diffuse en lumière atténuée avec cependant, comme pour la Phosphatase, quelques granules dans les gros chloroplastes, mais sans auréole réfringente, le plus souvent.

Les Phosphatases et ATP^{ases} alcalines présentent de grandes similitudes au point de vue localisation cellulaire.

c) Phosphatases et ATP^{ases} acides L'activité devient alors presque nulle. Pour les phosphatases, elle est faiblement présente mais très localisée dans de petits chloroplastes groupés sur les bords de cellules. Les gros ne sont pas marqués. L'atténuation de lumière induit une très faible activité de la phosphatase mais pas de l'ATP^{ase}.

3° Sucres

L'anisaldéhyde, l'urée chlorhydrique, le phtalate d'aniline, ont montré que les sucres libres se localisent dans des granules chloroplastiques très nets, soit internes soit périphériques. Le pourtour des chloroplastes est plus marqué par la présence de grains dans le cas de V₂ qui est pourtant moins riche d'une façon générale. Les réactions sont plus importantes en lumière atténuée, aussi bien chez les mutants que chez les témoins. Les gros chloroplastes comportent souvent de gros grains, au nombre limité, avec, presque toujours une auréole réfringente sur l'un d'eux, plus gros que les autres (anisaldéhyde) (Planches V et VI, (HT)).

L'atténuation de lumière rend les localisations moins nettes chez les témoins et V₁, mais au contraire, mieux situées en grains nets chez V₂ où il apparaît également des granules réfringents sur de petits chloroplastes.

4° Amino-acides libres

L'importance du métabolisme des amino-acides libres dans les mutations chlorophylliennes nous a conduit à approfondir plus particulièrement la question de leur localisation histochimique. Deux techniques ont été développées (KHAU VAN KIEN et BOUNIAS, 1969 (132)).

- { Détection chimique (ninhydrine, sels de cuivre, chlorhydrate de p. Nitro Benzoyl)
- { Détection cytocristallographique (cristallisation)

Les principaux résultats sont résumés ci-dessous.

a) Détection chimique

L'étude de base a été effectuée sur Tradescantia. Les amino-acides sont plus abondants en lumière atténuée, avec quelques diffusions cytoplasmiques près des membranes. Cependant, les localisations principales sont de trois sortes (Planche VII (HT)).

- Dans des grains ovoïdes, colorés, assez gros, au nombre de 1 à 4 situés dans les chloroplastes en des lieux rappelant les centres de formation de lipides et caroténoïdes, ou ressemblant à des grains d'amidon. Les amino-acides déposés sur ces éléments forment une enveloppe ou croûte périphérique.
- Dans des éléments de taille moyenne rappelant des grana, avec parfois des vésicules plus petites d'apparence inter-lamellaire.

...

- Dans des granules plus ténus, dispersés dans le stroma ou à la périphérie selon l'état physiologique du chloroplaste. Ces éléments sont particulièrement abondants avec la ninhydrine.

b) Localisation et identification par cytocristallographie

La technique de cristallisation in situ, a permis de retrouver les mêmes localisations que par voie chimique, mais elle a apportée une précision supplémentaire par l'identification de quelques acides particuliers, grâce à la comparaison avec les types de cristaux obtenus à partir de la gamme des 20 principaux amino-acides naturels, dans les mêmes conditions de cristallisation (Planches I - II - III - IV (HT)).

Le chloroplaste est uniformément vert au début ; puis par déshydratation, il apparaît une structuration interne avec des vésicules périgranaires et interlamellaires, l'ensemble rappelant le réseau grana. Les vésicules se développent ensuite et les cristaux les plus abondants se forment alors sous l'aspect d'abord de pointes, qui s'organisent en branches, pour aboutir à des sphéro-cristaux de leucine. La valine et l'iso-leucine en forment également de légèrement différents, par l'aspect des branches, et bien moins abondants. (Planches VI et VII (HT)).

Les réactions cytocristallographiques mettent en évidence les produits dont la concentration est la plus élevée, en un point donné et laissent dans l'ombre les produits les moins abondants ou les moins insolubles dans la glycérine. A ce sujet, l'addition d'éther éthylique à la glycérine améliore l'insolubilisation des amino-acides et fait apparaître plus de cristaux, mais en modifiant la forme de certains (sphéro-cristaux à pointes moins aigües).

Les caractérisations peuvent être obtenues sur des chloroplastes isolés par "empreintes". Les sphéro-cristaux de leucine sont encore les plus abondants.

Ces divers résultats ont été confirmés chez l'Orge, mais à une échelle plus réduite, les chloroplastes étant beaucoup plus petits que chez Tradescantia.

B - ETUDE COMPAREE DES AMINO-ACIDES LIBRES DANS LES CHLOROPLASTES ET LE CYTOPLASME ISOLES ET PURIFIES CHEZ Tradescantia

Cette expérience a pour but de comparer le métabolisme des amino-acides libres dans des fractions de chloroplastes et de cytoplasme isolées et purifiées par voie sèche (sans pertes de substances hydrophiles) dans des conditions physiologiques entraînant des variations de teneurs : lumière normale et lumière atténuée. Les résultats permettront une confrontation avec les techniques cytocristallographiques.

1° Conditions expérimentales

Les lots de feuilles comportent 22 g de matière fraîche. Le traitement en lumière atténuée comporte un passage de 1 h sous 50 lux, (ce qui nous situera au début des variations de teneurs).

Après lyophilisation, il reste 2,25 g de matière sèche dans le lot lumière normale, et, 1,40 g dans le lot lumière atténuée. La teneur en eau est donc plus élevée après atténuation de lumière.

Séparation des constituants cellulaires

La nervure centrale et le pétiole sont enlevés, et le matériel, passé à l'azote liquide, est broyé au mortier dans un peu d'éther de pétrole. La poudre humide obtenue, est passée au tamis (maille 150 μ) jusqu'à épuisement des particules. 67 % de la matière sèche sont alors éliminés. Les débris les plus gros sont filtrés sur coton lâche. La poudre fine sèche contient des éléments cellulaires qui vont être séparés grâce à leurs densités différentes sur des milieux apolaires de densités différentes (KHAU VAN KIEN, 1968 (131)). (Tableaux LVII et LVIII(HT)). Les gradients de densité ont été obtenus à l'aide du mélange : (éther de pétrole + tétachlorure de carbone). Cette technique nous a permis d'obtenir les quantités suivantes d'éléments cellulaires :

	Lumière normale		Lumière atténuée	
	Chloroplastes	Cytoplasme	Chloroplastes	Cytoplasme
Poids sec (mg)	20 $\pm$ 5	119 $\pm$ 7	13 $\pm$ 5	70,5 $\pm$ 10
% du poids sec de feuilles	0,89 %	5,30 %	0,93 %	5,03 %

2° Résultats biochimiques

Les amino-acides ont été extraits et dosés selon la technique habituelle. Les résultats sont rapportés au poids sec de feuilles et au poids sec de constituants séparés. Les variations spécifiques des divers amino-acides sont traduites par le pourcentage relatif de leur teneur par rapport à la quantité totale de l'extrait (nM)(Tableaux LIX et LX (HT)).

Ces résultats méritent d'être examinés sous deux angles principaux :

- différences de teneurs entre chloroplastes et cytoplasme
- variations spécifiques par atténuation de lumière, respectivement dans les chloroplastes et le cytoplasme

3° Interprétation des résultats

a) Comparaison des teneurs respectives du cytoplasme et des chloroplastes

En valeur absolue, le cytoplasme contient en tout, environ trois fois plus d'amino-acides que les chloroplastes, cependant, il représente une masse plus importante.

Les teneurs spécifiques des chloroplastes (en nM/mg de poids sec)(tableau LX) sont, en définitive, nettement plus importantes que celles du cytoplasme, ce qui confirme les observations cytochimiques montrant que les amino-acides sont plus concentrés dans les chloroplastes que dans le cytoplasme. Nous n'avons décelé aucune exception parmi les amino-acides analysés.

Contrôle histologique de pureté

Les chloroplastes isolés par voie sèche ont été examinés au microscope lors des diverses étapes de la purification. Leur richesse en amino-acides est telle qu'il a été possible d'obtenir par la technique habituelle leur cristallisation in situ, preuve supplémentaire de l'origine réellement chloroplastique de ces cristaux.

b) Comparaison des variations en lumière atténuée dans les chloroplastes et dans le cytoplasme

Les variations exprimées par rapport aux poids secs et celles exprimées en % relatifs sont très souvent de même sens (tableau LXX (HT)).

Chez Tradescantia, un court traitement en lumière atténuée entraîne une diminution de teneur en amides (asparagine et glutamine).

L'acide glutamique diminue, également, ainsi que la méthionine.

Conformément aux résultats fréquemment obtenus chez l'Orge et l'Arabidopsis, la thréonine et l'alanine sont peu sensibles aux variations de lumière ; de même, la quantité totale d'acide aminobutyrique reste invariant ainsi que celle d'ornithine et de tyrosine. Mais dans ces trois derniers cas, les acides aminés migrent vers l'extérieur du chloroplaste et vont enrichir le cytoplasme. Les quantités disparues dans le premier se retrouvent exactement dans le second.

Les variations de composition relative nous ont conduit à établir un classement des amino-acides selon leurs affinités de tendance chloroplastique, cytoplasmique ou mixte. Le tableau ci-dessous traduit une indication de tendance, mais non pas une spécificité.

Tendance chloroplastique	tendance cytoplasmique	Tendance mixte
Iso-leucine	Asparagine	Lysine
Leucine	Glutamine	Arginine
Histidine	Ac. Glutamique	Ac. Aspartique
Glycocolle	Thréonine	Sérine
Tryptoph.	Alanine	Proline
Lysine	Ac. γ Am. Butyrique	Phényl-Alanine
		Valine

Ces considérations permettent d'avoir une idée de la part respective des chloroplastes et du cytoplasme dans les variations observées chez l'Orge et l'Arabidopsis. Les amino-acides qui subissent les plus fortes variations (par exemple en lumière atténuée) au cours de divers troubles de la photosynthèse se retrouvent classés parmi les chloroplastiques ou les mixtes. Ceux qui ne varient pas de même sont plus particulièrement ceux qui sont classés cytoplasmiques. Le chloroplaste semble donc constituer le site préférentiel des troubles métaboliques que nous étudions.

Pour terminer, signalons que l'extraction par voie sèche permet un excellent rendement en amino-acides alors que par voie "humide", il se produit beaucoup de pertes par diffusion dans le liquide de suspension des chloroplastes. Quelques rendements maxima obtenus par voie humide sont indiqués hors texte (Tableau LXII)

CHAPITRE IV

ETUDES PHYSIOLOGIQUES A L'AIDE D'INHIBITEURS SPECIFIQUES DU METABOLISME CHEZ LES PLANTS D'ORGE NORMALES ET MUTES

A - Effets biochimiques de quelques inhibiteurs sur les plants normaux

1° inhibiteurs de la glycolyse

2° autres cas d'inhibitions :

synthèse d'ATP

synthèse de glycocolle

synthèse d'ARN

B - Inhibition comparée de la photophosphorylation chez les plants d'Orge normaux et mutés

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines voies métaboliques permet de créer artificiellement des troubles analogues à ceux qu'aurait pu produire une mutation affectant la même réaction par voie génétique. Il s'agit alors de phénocopies de mutants.

Cette technique devient particulièrement intéressante pour nous, lorsque les effets de l'inhibition se traduisent chez les plantes initialement saines, par un phénotype de mutants chlorophylliens dont l'origine biochimique est alors connue par définition.

Nous allons rechercher les effets sur les plants normaux de quelques inhibiteurs des grandes voies métaboliques, puis nous examinerons l'effet sur les témoins et les mutants d'une inhibition de la photophosphorylation proprement dite.

A - EFFETS BIOCHIMIQUES DE QUELQUES INHIBITEURS SUR LES PLANTS D'ORGE NORMAUX

Nous avons choisi les exemples suivants, illustrés sur la fig. XII(HT).

- 1) Les ions $F^{(-)}$ (NaF) qui inhibent la formation d'acide phospho-énol-pyruvique à partir de l'acide phosphoglycérique, peuvent affecter les plantes comportant une carboxylation préférentielle du type C_4 et bloquer l'utilisation des sucres photosynthétisés dans le cycle C_3 .
 - 2) L'acide monofluoroacétique : FCH_2COONa inhibe la synthèse d'acide citrique à partir de l'acétyl coenzyme A et de l'acide oxalacétique, ce qui pourrait avoir une incidence dans la synthèse des chlorophylles.
- ...

- 3) Un sulfamide (sulfaguanidine) inhibant la synthèse du glycocolle par compétition avec l'acide p. amino-benzoïque, (donc des chlorophylles)
- 4) L'aza-guanine, un inhibiteur de la synthèse protéique agissant au niveau ARN, donc plutôt sur les réactions chloroplastes-cytoplasme
- 5) Le Di Coumarol : un agent découplant limitant la formation d'ATP

1° Inhibition de la glycolyse

Les inhibiteurs ont été utilisés à diverses concentrations et nous avons retenu celle donnant un aspect viridis plus ou moins prononcé :

- pour NaF : 0,03 mM/ml de liquide nutritif - traitement : 3 j.
- pour FCH_2COONa : 0,03 mM/ml de liquide nutritif - traitement : 7 j.

Morphologie : les lots mis en présence d'inhibiteurs ont pratiquement cessé leur croissance (ou fortement ralenti) dans les 24 H qui ont suivi le début du traitement. Nous présentons maintenant brièvement les résultats essentiels.

a) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Les résultats sont indiqués dans les tableaux LXIII et LXIV (I)

La réduction de synthèse pigmentaire est générale, mais FCH_2COONa affecte plus les chlorophylles que NaF et moins les caroténoïdes, dont le précurseur, l'Acétyl-Co A., se situe avant le point d'inhibition.

Au niveau des cofacteurs, FCH_2COONa entraîne une augmentation du plasto-chroménol au détriment des autres formes, y compris de la p.Q.A. Cela correspond à une mise en réserve forcée des formes actives de cofacteurs photosynthétiques consécutive à la chute de teneurs en chlorophylles.

b) Amino-acides libres

Les amino-acides s'accumulent dans de nombreux cas, à l'exception de l'alanine, l'asparagine, l'acide γ amino-butyrique (avec NaF et FCH_2COONa), le tryptophane (avec NaF) et la leucine (avec FCH_2COONa)² qui diminuent après action des inhibiteurs (Tableau LXV (HT)). La réaction d'accumulation des amino-acides libres consécutive à la chute de teneurs en chlorophylles a pris le dessus sur l'inhibition des voies de biosynthèse qui aurait dû réduire la formation de ces mêmes amino-acides, excepté pour NaF dans le cas de l'alanine.

Le cycle C_4 de carboxylation peut fonctionner en présence de FCH_2COONa car l'accepteur est situé avant le point de blocage.

c) Sucres libres

L'interruption des voies de la glycolyse (phases anaérobie puis aérobie) conduit à une spectaculaire accumulation des formes glucidiques de réserve (plus de 10 fois) : saccharose et maltose (Tableau LXVI (HT)). Le maltose est plutôt accumulé par NaF alors que le saccharose est prédominant dans le cas de FCH_2COONa . Dans ce dernier cas, le glucose et le fructose s'accumulent aussi (environ 2 fois) alors qu'ils ne varient presque pas sous l'action de NaF ; peut-être leur utilisation dans d'autres voies situées avant l'inhibition est-elle favorisée dans ce cas (Ribose, par exemple).

Ces deux premiers cas d'inhibition se répercutant sur la photo

synthèse ont donc fait apparaître quelques particularités au niveau des caroténoïdes et des cofacteurs, mais il apparaît surtout que pour altérer le métabolisme du saccharose, l'effet d'une mutation doit être assez profond pour atteindre la glycolyse et le cycle de Krebs.

2° Autres cas d'inhibitions

{ synthèse du glycocolle
 { synthèse protéique (ADN)
 { synthèse d'ATP

Dans le cas du sulfamide, de l'azaguanine, et du di-coumarol, les répercussions sur le métabolisme ont été un peu moins brutales et rapides que précédemment, aussi avons nous présenté les résultats juxtaposés à deux stades de ces effets choisis parmi les plus intéressants quant à leurs conséquences biochimiques. Les conditions expérimentales sont rapportées ci-dessous :

Inhibiteurs	Doses extrêmes	Doses retenues	Durées de traitement	
Sulfamide	1 - 10 mg/ml	1 mg/ml	14 j	21 j
Azaguanine	2.10^{-3} - 20.10^{-3} mM/ml	20 μ M/ml	14 j	21 j
Coumarol	0,04 - 0,08 mM/ml	80 μ M/ml	14 j	21 j

a) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Les teneurs pigmentaires diminuent rapidement sous l'effet du sulfamide et un peu plus lentement après action du Di coumarol et de l'Aza-guanine. Seules, les teneurs en lutéine se rétablissent après prolongement des traitements (Tableau LXVII (HT)).

Le résultat le plus important, (outre les variations d'état d'oxydo-réduction des Xanthophylles) est la néo formation d'un dérivé du β carotène plus polaire que celui-ci. Ce composé migre avec le carotène sur alumine, mais il s'en sépare sur gel de silice, les chlorophylles et Xanthophylles restant sur la ligne de départ : fig.(30).

Ce composé est apparu en abondance après action des sulfamides pendant 21 jours et en faible quantité après action de l'azaguanine (21 jours aussi).

Le spectre d'absorption de ces composés a été tracé sur plaque seulement, en raison des très faibles quantités obtenues. Les longueurs d'ondes aux maxima sont indiquées ci-dessous :

carotène (plants normaux) : 410 - 443 - 463 nm
 carotène (+ sulfamide) : 410 - 441 - 464 nm
 dérivé du carotène (+ sulfamide) : 404 - 435 - 462 nm

Par rapport à celui du β carotène, le spectre du dérivé présente un déplacement vers les courtes longueurs d'onde (effet hypsochrome) et une remontée considérable de la D.O. du premier pic, ce qui traduit la très forte augmentation du caractère polaire de ce produit. Nous pensons qu'il s'agit d'une forme époxyde ou hydroxylée du carotène.

...

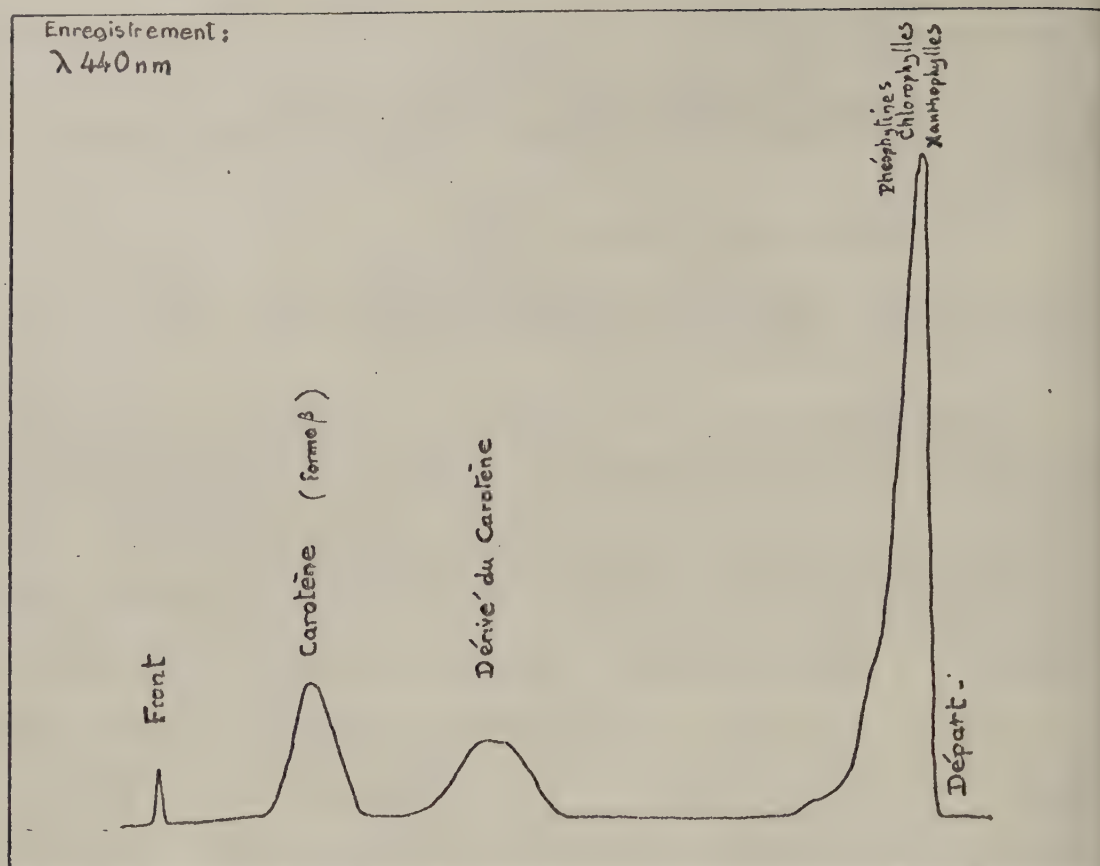


Fig. (30) - Chromatographie des carotènes apparus après long traitement par le sulfamide.

Les variations de teneurs en pigments chlorophylliens ne sont pas répercutées de façon très significative sur les cofacteurs (tableau LXVIII (HT)). Sur ce plan, ces trois types d'inhibition diffèrent beaucoup des deux premiers.

b) Amino-acides libres

L'action spécifique du sulfamide sur la synthèse du glycocolle se traduit parfaitement sous forme d'accumulation massive de son précurseur : la sérine (de 4 à 9 fois plus) (Tableau LXIX (HT)). L'action du di-coumarol, bien que réduisant les teneurs en pigments, ne se traduit pas par une augmentation des teneurs en amino-acides libres. Tout se passe comme si, par manque d'ATP, les amino-acides libres relargués dans les cellules étaient aussitôt consommés, faute d'énergie, pour de nouvelles synthèses : c'est, du moins, ce que pourrait donner à penser la consommation d'asparagine en fonction du temps (de 24 à 31 j).

La sulfamide et l'aza-guanine présentent, par contre, des points communs, dans le sens des accroissements et de nombreuses variations sont, en moyenne, assez comparables quantitativement. Cette identité s'explique, car la synthèse des bases puriques nécessite un apport de glycocolle et en définitive, la sulfamide entraîne, comme l'aza-guanine, une diminution de la synthèse d'ARN. Cet effet commun, plus prononcé encore, dans le cas sulfamide, se traduit dans la formation du dérivé caroténoïdique dont la cause d'origine est ainsi mieux définie. De plus, dans ces deux cas, l'asparagine s'accumule fortement comme lors des mutations chlorophylliennes.

Ces points communs vont se retrouver dans l'étude des sucres.

c) Sucres libres

Il se produit, à nouveau, une très forte accumulation de saccharose, beaucoup plus intense après action de l'aza-guanine et du sulfamide (Tableau LXX (HT)). Le glucose et le fructose voient leur teneur augmenter dans les trois cas : il doit, essentiellement, s'agir d'un défaut d'utilisation dont les effets sont souvent perceptibles chez les mutants chlorophylliens les plus altérés (tels que V_3)

En résumé, cette série d'expériences nous a fait apparaître quelques aspects intéressants des relations entre divers groupes métaboliques au cours de troubles de la photosynthèse.

Un blocage de la carboxylation de type C_4 est réalisé par suppression du substrat après action de NaF. Il se traduit par une chute de teneurs pigmentaires, une réduction des cofacteurs, sauf le tocophéryl-chroménol qui augmente, et une accumulation massive de maltose, puis, (à un degré moindre), de saccharose et de ribose. Dans ce cas, comme avec FCH_2COOH , les amino-acides suivent leur variation opposée au sens des variations chlorophylliennes. Ce n'est pas le cas pour l'agent découplant qui n'agit que lentement sur la photosynthèse.

Sulfamide et Azaguanine, qui affectent la synthèse d'ARN, entraînent l'apparition d'une forme oxydée de carotène. Leur effet est très net dans la réduction de l'équipement pigmentaire et l'accumulation des amino-acides et des sucres.

Rappelons, à ce sujet, que les mutations chlorophylliennes sont plutôt dues à une origine "cytoplasmique" que nucléaire (80), ce qui est compatible avec un effet dû à l'ARN. BERRY et SMITH, 1970 (17) ont d'ailleurs montré qu'une inhibition de synthèse protéique pouvait se répercuter sur la synthèse chlorophyllienne. L'idée de relation entre troubles de la photosynthèse et perturbations au niveau de l'ARN, se trouve renforcée par les résultats des travaux de KNIPL et KULAEVA, 1970 (134) qui ont montré que la coumarine inhibe l'incorporation de leucine- ^{14}C dans l'ARN des feuilles d'Orge. L'effet lent du di-coumarol sur la photosynthèse fait alors penser à un retour au mécanisme de l'azaguanine et du sulfamide.

Une relation entre photosynthèse et amino-acides peut alors être entrevue au niveau de l'activation de ceux-ci sous forme aminoacyl-ARN ^{t} , réaction où la phosphorylation et l'ATP jouent un rôle important.

B - COMPARAISON DE L'INHIBITION DE LA PHOTOPHOSPHORYLATION CHEZ LES PLANTS D'ORGE NORMAUX ET MUTES

Les troubles de la photosynthèse ont souvent leur siège ou des conséquences au niveau de la phosphorylation dont nous avons étudié ici un cas d'inhibition spécifique : par le para-chloro-mercurobenzoate à dose faible (p.C.M.B.).

Les travaux de ISAWA et GOOD, 1969 (114) ont montré que le p.C.M.B. est un inhibiteur spécifique de la photophosphorylation à faibles doses, soit $0,5 \cdot 10^{-4}$ M pour une suspension de chloroplastes représentant 40 μg de chlorophylles pour 2 ml de milieu. Ce dérivé est ensuite inhibiteur du transfert d'électron à doses plus élevées. Par analogie avec ces paramètres, nous avons utilisé une dose située dans la limite de la spécificité pour la photophosphorylation, soit

$0,3.10^{-4}$ M pour une concentration équivalente en chlorophylles.

Les plants traités au stade 8 jours, ont accusé immédiatement un fort ralentissement de croissance. Le traitement a duré en tout 14 jours. Les résultats biochimiques sont, maintenant, exposés de façon juxtaposée pour les plants normaux et mutés, témoins et traités au p.C.M.B.

1°) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Tableau (37) - Variation des teneurs en pigments chlorophylliens dans les plants normaux et mutés, sous l'effet du p.C.M.B. (nM/mg)

Pigments	Témoins		V ₁		V ₂		V ₃	
	N	pCMB	N	pCMB	N	pCMB	N	pCMB
Chl. (a)	0,79	0,696	0,844	0,695	0,65	0,620	0,77	0,620
Chl. (b)	0,33	0,298	0,368	0,311	0,28	0,282	0,404	0,282
Phéophytine	0,035	0,203	0,10	0,086	0,248	0,183	0,34	0,183
Carotène	0,120	0,243	0,147	0,186	0,115	0,236	0,19	0,236
Néo-Carotène	0	0,0354	0	0	0	0,0451	0	0,0451
Lutéine	0,244	0,183	0,227	0,183	0,183	0,1916	0,215	0,1916
Viola-X.	0,127	0,105	0,118	0,085	0,070	0,0573	0,097	0,0573
Néo-Xanth.	0,077	0,0675	0,065	0,058	0,060	0,0411	0,0643	0,0411

L'inhibition de la photophosphorylation entraîne une réduction des teneurs pigmentaires qui tend à les homogénéiser chez les témoins et les mutants, à l'exception du carotène qui se double d'un nouveau dérivé plus polaire, comme précédemment, mais, seulement chez V₂ et les plants normaux, ainsi que V₃ à un degré bien moindre.

Ce composé présente un comportement chromatographique sur alumine et sur silice qui le classe dans les carotènes. Son spectre présente les caractéristiques suivantes

Composé et Origine	λ maxima/et D. O. $\times 10^{-3}$			λ minima/et D. O.	
	nm	nm	nm	nm	nm
Carotène normal.....	423/43	445,5/55	471,5/49	464/48	
Néo-carotènes: témoins+pCMB...	418,5/46	441/62	468,7/54	458/46	423/43
V ₂ + pCMB.....	418 "	440 "	469 "	459 "	426,

$\lambda 440 \text{ nm.}$

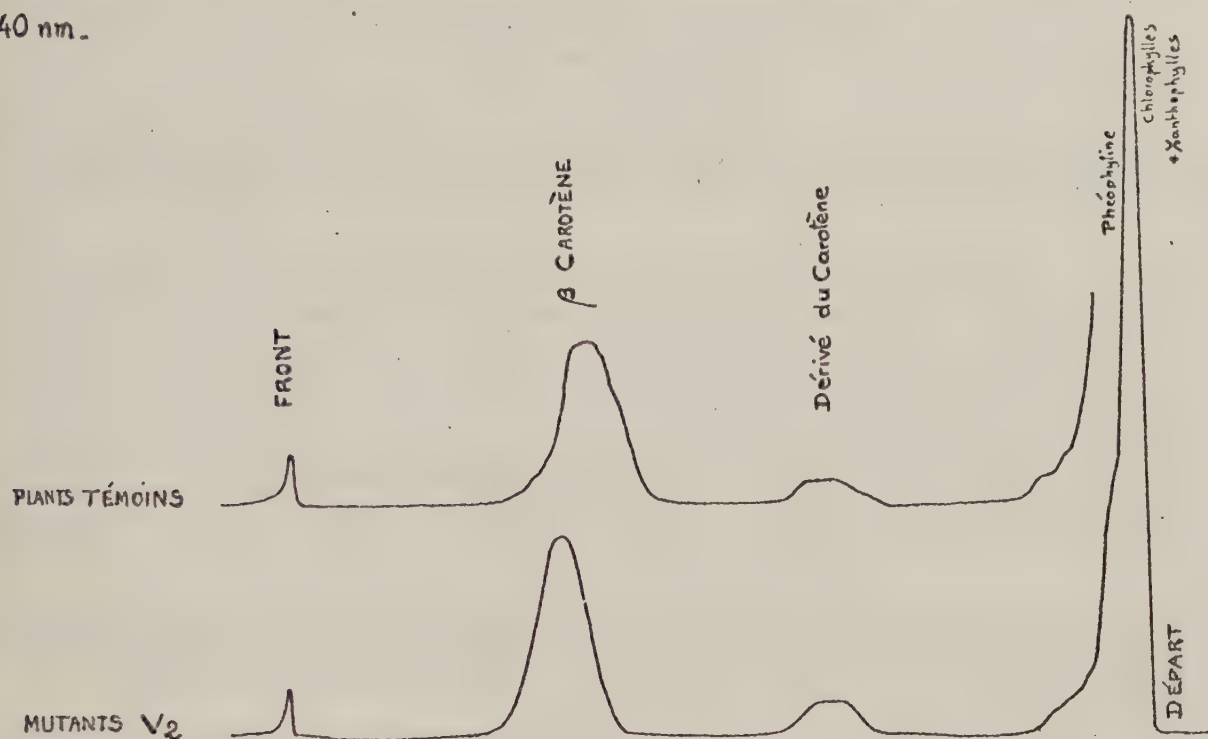


Fig. (31) - Enregistrement d'une chromatographie montrant la séparation des deux formes de carotène sur gel de silice

L'examen des spectres montre que ce composé présente un déplacement des λ maxima vers les courtes longueurs d'ondes, ainsi qu'une élévation de la D. O. du premier pic (moins prononcée que dans le cas de l'inhibition par la sulfamide, alors que le déplacement vers les courtes longueurs d'ondes l'est, au contraire, nettement plus). Un creusement des minima peut évoquer la transformation du β -carotène en un dérivé monocyclique, voire aliphatique.

L'apparition probable de groupements polaires sur le carotène dans le cas d'une inhibition de la photophosphorylation donne à penser qu'il pourrait s'agir, soit d'un dérivé phosphorylé, soit d'un dérivé hydroxylé (ou forme intermédiaire époxyde) prêt à être phosphorylé.

Au niveau des cofacteurs, les réactions observées sont particulièrement intéressantes : le p.C.M.B. entraîne une accumulation importante de formes actives de chroménols, mais, proportionnellement, de moins en moins, chez les mutants, en allant de V_1 à V_3 : la forme plasto-chroménol, par contre, augmente plus chez V_2 et V_3 (Tableau LXXI (HT)).

La p.Q.A. épouse les variations d'apparition du néo-carotène : elle augmente nettement moins chez les témoins et V_2 que chez V_1 et V_3 , c'est-à-dire dans les cas où se forme le dérivé.

La voie de phosphorylation dans laquelle interviennent les plastoquinones et leurs dérivés phosphorylés pourrait donc bien faire intervenir, également, les carotènes sous diverses formes dérivées.

...

2°) Amino-acides libres

Les teneurs en la plupart des amino-acides libres augmentent parallèlement à la décroissance de teneurs pigmentaires sous l'effet du p.C.M.B. (Tableau LXXII (HT)). Cependant la proline est accumulée aussi, de même que l'ornithine, dans les cas V_1 et V_3 qui ne synthétisent pas le dérivé du carotène.

La leucine est fortement accumulée, surtout chez les mutants tandis que la valine et l'iso-leucine présentent des variations de moindre amplitude et diminuent chez les témoins et chez V_1 .

3°) Sucres libres

L'atteinte à la photophosphorylation se traduit par une importante accumulation des sucres (sauf ribose) dont l'utilisation est d'autant plus ralentie que la croissance des plantes est plus diminuée. Le freinage de leur consommation l'emporte donc sur celui leur synthèse. (Tableau LXXIII (HT)).

Le mutant V_3 accumule plus de saccharose (et de glucose) que les autres plants : c'est un caractère que l'on retrouve presque exactement chez le mutant le plus touché dans la catégorie viridis.

En résumé, au cours de cette deuxième partie, nous avons pu montrer quelques particularités physiologiques intéressantes intervenues sous l'effet des mutations et de traitements appropriés.

Après étiolement à l'obscurité totale, les mutants V_2 et V_3 résistent mieux (et reverdissent mieux) que les plants normaux ou les mutants V_1 . Peut-être sont-ils aidés, en cela, par la néo-formation d'un dérivé de la lutéine qui pourrait jouer un rôle dans l'amélioration de leur métabolisme photosynthétique. Dans ce cas, c'est la présence de la mutation qui aurait favorisé l'établissement d'une voie de compensation que le traitement subi a fait apparaître de façon appréciable.

L'emploi d'inhibiteurs spécifiques a montré la possibilité d'intervention du carotène, par l'intermédiaire de dérivés plus ou moins oxydés, dans les cas de troubles de la photosynthèse et de la photophosphorylation. Certaines mutations sont capables d'estomper ou de supprimer de telles réactions. D'autre part, c'est dans le cas d'atteintes profondes de la glycolyse que sont observées les accumulations de saccharose.

Les expériences d'incorporation d'acétate- ^{14}C ont permis, enfin, de traduire le ralentissement du métabolisme des pigments chez les mutants ainsi que leurs voies de glucogénèse de compensation.

Nous allons maintenant essayer de relier avec plus de précision les notions de photosynthèse et de phosphorylation avec le métabolisme des amino-acides, dont l'interdépendance reste un facteur constant des diverses expérimentations.

TROISIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LE ROLE DES AMINO-ACIDES DANS LA REGULATION DU FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE

- Chapitre - Double effet de l'absorption cellulaire de L-Leucine sur l'équipement photosynthétique chez l'Orge
- A - Etude biochimique
 - B - Etude histochimique
- Chapitre II - Effets inhibiteurs de la L-leucine et de la DL-Aza-Leucine sur l'appareil photosynthétique de l'Orge et de l'Arabidopsis
- A - Etude chez l'Orge
 - B - Action chez l'Arabidopsis
- Chapitre III - Action de la L-leucine sur la stimulation du verdissement des plants d'Orge et d'Arabidopsis normaux et mutés
- A - Etude chez l'Orge
 - B - Etude chez l'Arabidopsis
- Chapitre IV - Effets de la leucine et de l'aza-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge (normaux et mutés)
- A - Rôle de la leucine : influence de la dose
 - B - Mécanisme d'inhibition de l'activité phosphatasique par la leucine in vitro
 - C - Effets de la leucine et l'aza-leucine in vivo sur l'activité phosphatasique de plants normaux et mutés
 - D - Etude histochimique du rôle de la leucine sur les phosphatases et ATPases

INTRODUCTION

Les différentes expériences biochimiques nous ont montré qu'il existe plusieurs sortes de relations entre les amino-acides libres et la photosynthèse : chez l'Orge et l'Arabidopsis, une atténuation de lumière réduisant les taux de pigments entraîne une augmentation rapide et importante de teneur en leucine et iso-leucine, cependant que, chez Arabidopsis, leucine et iso-leucine sont anormalement concentrées chez le mutant. De nombreux autres amino-acides subissent des variations de même sens, mais d'amplitude plus faible, et paraissent systématiquement liés aux variations chlorophylliennes.

Cependant, la leucine est spécialement abondante au niveau des chloroplastes (comme l'a démontré la cytocristallographie) et sa présence près des sites d'activité phosphatasique, a plus particulièrement retenu notre attention. De plus, cet amino-acide présente des relations physiologiques très particulières avec divers pigments de l'équipement photosynthétique.

L'étude qui suit lui sera donc consacrée, mais il est très possible que d'autres amino-acides, tels la valine et l'iso-leucine, puissent jouer, également dans certains cas, un rôle voisin ou complémentaire.

CHAPITRE I

ABSORPTION CELLULAIRE DE L-LEUCINE, ET REPERCUSSIONS SUR L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE CHEZ L'ORGE

- A - Etude biochimique
- B - Etude histochimique

A - ETUDE BIOCHIMIQUE

L'étude suivante va montrer les deux volets du rôle de la leucine vis-à-vis de la photosynthèse, en fonction de la quantité absorbée par les cellules végétales. Le problème de l'absorption en fonction de la concentration extérieure a été traité en utilisant des concentrations allant jusqu'à $24 \mu\text{M}/\text{cm}^3$ soit $120 \mu\text{M}/\text{plant}$. La durée du traitement est de 13 jours.

Observations morphologiques : la croissance des plantes (particulièrement au niveau de la 1ère feuille) passe par un maximum pour les doses allant de 2 à $8 \mu\text{M}/\text{cm}^3$. (Tableau LXXIV (HT)).

Les résultats biochimiques sont rapportés dans les paragraphes suivants.

1°) Pigments et cofacteurs

Tableau (38) - Variations de teneurs en pigments chlorophylliens en fonction des quantités de leucine administrées (nM/mg - $\mu\text{M}/\text{cm}^3$).

Pigments nM/mg	Doses administrées ($\mu\text{M}/\text{cm}^3$) (= 10^{-3} M)					
	0	2	4	8	16	24
1. (a)	0,90	0,93	1,05	1,065	0,69	0,48
1. (b)	0,434	0,504	0,540	0,52	0,32	0,22
Protène	0,205	0,208	0,198	0,221	0,236	0,230
o- rotène	0	0	0	0,010	0,079	0,159
téine	0,310	0,326	0,34	0,301	0,225	0,140
ola-X.	0,157	0,179	0,020	0,187	0,153	0,101
o-Xanth.	0,068	0,066	0,075	0,073	0,052	0,037

La leucine induit d'abord un accroissement significatif des teneurs en chlorophylles (a) et (b) ainsi qu'en viola-xanthine aux faibles doses (de 2 à 8 $\mu\text{M}/\text{cm}^3$) suivi d'une nette diminution aux doses supérieures. Parallèlement, les teneurs en lutéine et en néo-xanthine augmentent un peu moins, mais sont à leur tour inhibées par les doses 16 et 24 $\mu\text{M}/\text{cm}^3$. Enfin, le carotène, assez stable jusqu'à 4 $\mu\text{M}/\text{cm}^3$ tend à s'accumuler aux doses élevées.

L'un des points les plus importants est l'apparition d'un nouveau dérivé du β carotène sous l'effet des concentrations élevées de leucine. Ce composé migre avec le β carotène sur alumine mais s'en sépare sur couche de silice, comme le montre la figure (32)

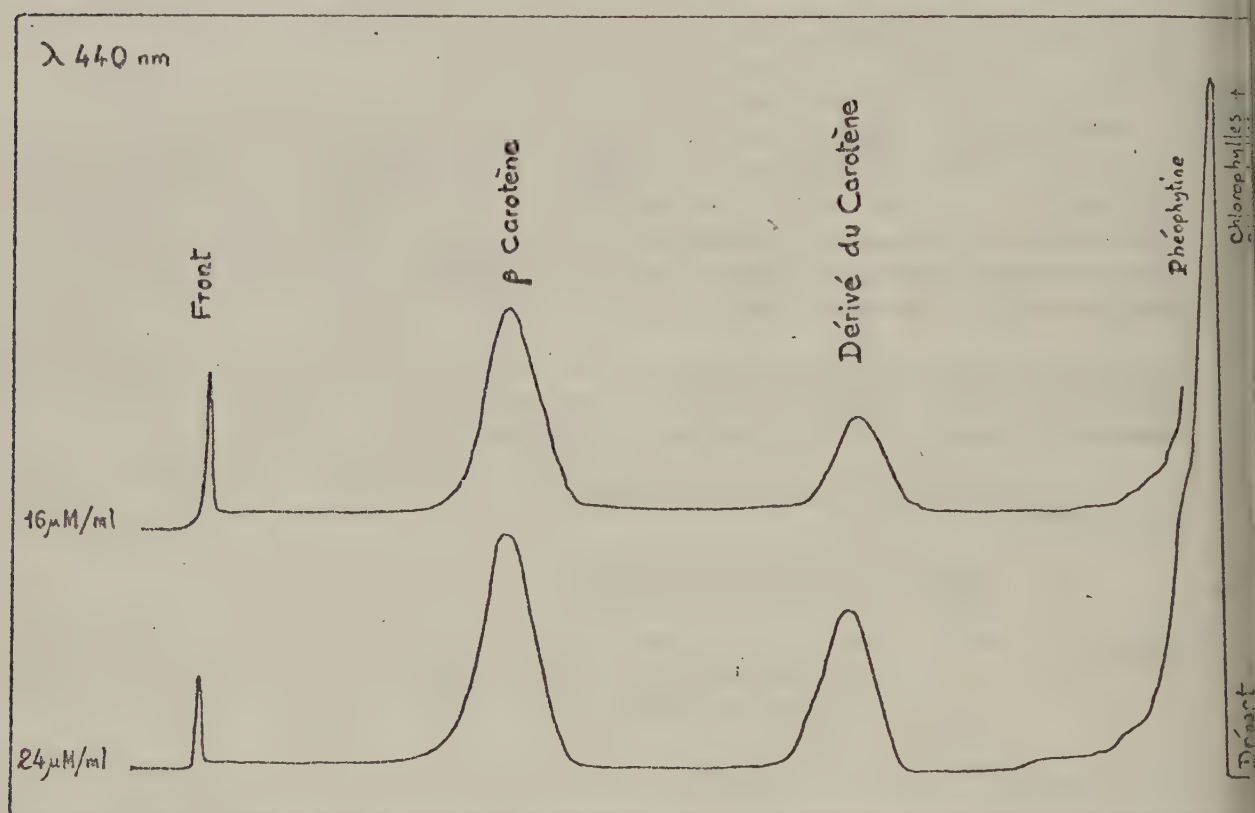


Fig. (32) - Séparation sur couche de gel de silice du carotène et de son dérivé obtenu par action des fortes concentrations de leucine.

Le spectre de ce composé, après isolement et purification, présente des caractéristiques très voisines de celles du néo-carotène apparu sous l'effet du p.C.M.B. :

Composés	$\lambda_{\text{maxima}}/\text{DO} \times 10^{-3}$			$\lambda_{\text{minima}}/\text{DO} \times 10^{-3}$	
β carotène	424,5/52	446,5/67	473 /58	465/57	
néo-carot. (leucine)	419 /47	441,5/73	470/ /63	458/46	425/47
néo-carot. (p.C.M.B.)	418,5/46	441 /62	468,5/54	458/46	423/46

L'hypothèse de l'identité de ces deux composés est encore renforcée par leur comportement chromatographique en couche mince.

Ce résultat est très important car il pourrait traduire l'un des mécanismes d'action de la L-leucine dans la physiologie de la photosynthèse.

La dose $8 \mu\text{M}/\text{cm}^3$ doit se situer à l'extrême limite de la zone de stimulation, car à ce niveau, les concentrations pigmentaires commencent à décliner par rapport au maximum tandis que le dérivé du carotène apparaît en très faible quantité.

La plupart des cofacteurs s'accumulent assez rapidement à partir des doses 16 et $24 \mu\text{M}/\text{cm}^3$. Cette réaction, qui rappelle également l'effet du p.C.M.B. sur les plants normaux, coïncide avec la réduction des teneurs en chlorophylles, pour les mêmes doses (Tableau LXXV (HT)).

2°) Amino-acides libres

Les résultats d'analyse des amino-acides libres sont consignés dans le tableau LXXVI (HT)). Le premier point qui retient l'attention, est la quantité de leucine absorbée par la plante en fonction de la dose reçue. La fig. (33) traduit la courbe :
[leucine interne] = f([leucine administrée]).

Cette courbe, qui rappelle les cinétiques de croissance biologique (bactéries, champes d'Arabidopsis), comme le confirme la représentation semi-logarithmique, évoque donc l'hypothèse d'un transport actif à travers les parois cellulaires.

L'incorporation se décompose en une phase d'absorption exponentielle suivie d'une phase "plateau".

Une coïncidence remarquable apparaît alors :

- La phase de stimulation des teneurs en chlorophylles correspond à la phase d'absorption exponentielle.

- La phase asymptotique correspond à la phase d'inhibition des teneurs en pigments et à l'apparition du dérivé du carotène qui traduit un trouble de la photophosphorylation.

Les autres amino-acides suivent une courbe d'accumulation plus régulière avec quelquefois, un plafond aux fortes doses. Cet accroissement, sensible dès les premières doses ($2 \mu\text{M}/\text{cm}^3$), ne suit pas les variations de photosynthèse : l'emploi de leucine- ^{14}C nous montrera pourquoi, au chapitre II.

D'autres amino-acides connaissent un extremum à la limite entre stimulation et inhibition : la thréonine, l'alanine, l'acide γ -aminobutyrique, ainsi que la sérine et le glycocolle.

L'asparagine, par contre, présente une réaction particulière : la quantité accumulée augmente lentement, puis, présente un point d'inflexion avec une importante augmentation à la limite de la phase d'inhibition, puis se stabilise selon une courbe d'apparence asymptotique (fig. VI (HT)).

Cette courbe, pour l'asparagine, traduit deux étapes :

- 1) une augmentation initiale très nette mais de même type que pour les autres amino-acides
- 2) une brutale montée au moment du passage à la phase d'inhibition.

La teneur anormalement élevée en asparagine peut donc être le

...

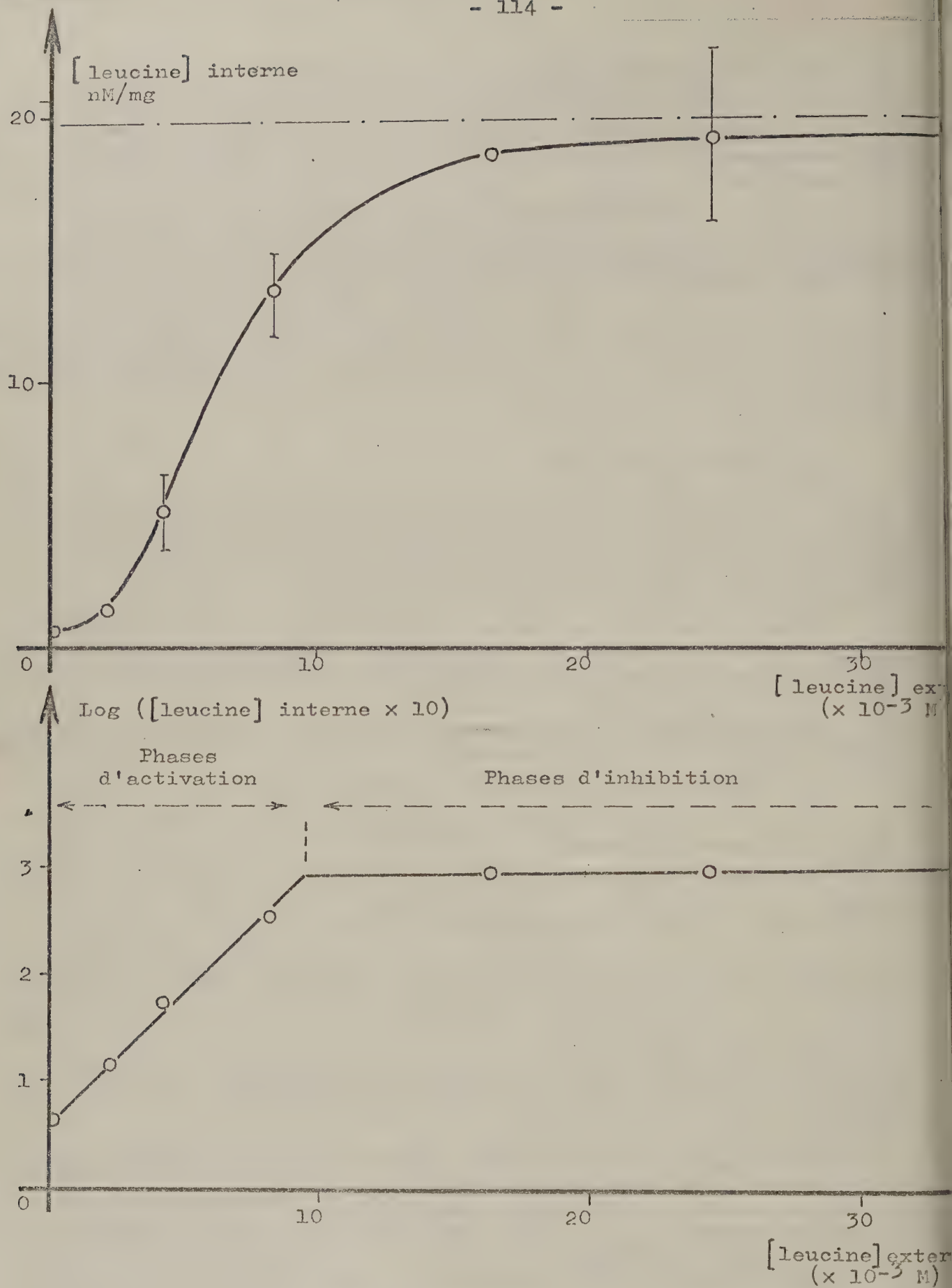


Fig. (33) - Relations entre quantité de leucine absorbée et quantité administrée chez l'Orge : courbes obtenues en coordonnées naturelles et semi logarithmiques

signe d'un trouble de la photosynthèse, ce qui confirme tout à fait les observations précédentes ainsi que certaines données bibliographiques encore non interprétées (225) sur l'accumulation de cet amide chez les mutants chlorophylliens.

3°) Sucres libres

Les sucres présentent, eux aussi, des variations significatives de l'activation, puis des troubles de la photosynthèse : ces deux phases se traduisent successivement par une diminution de teneur en glucose et fructose (bien métabolisés) puis une accumulation en fonction des perturbations croissantes. Seul le ribose reste à peu près indépendant des autres (Tableau LXXVIII (HT)).

Une accumulation de sucres, en particulier de saccharose apparaît donc, également, comme un indice permettant de diagnostiquer un trouble particulier de la photosynthèse, touchant vraisemblablement la phosphorylation. Cela rappelle à nouveau le cas du mutant V_3 d'Orge.

En conclusion, la leucine paraît capable, par son double effet sur la teneur en pigments chlorophylliens, de participer à un mécanisme de régulation de l'appareil photosynthétique.

La phase d'inhibition fait apparaître un nouveau dérivé du β carotène, et se répercute sur le métabolisme des sucres et amino-acides libres, en particulier, une forte accumulation d'asparagine et de saccharose.

B - ETUDE HISTOCHIMIQUE DE L'INCORPORATION DE LEUCINE- ^{14}C CHEZ L'ORGE ET L'ARABIDOPSIS

L'incorporation de leucine- ^{14}C -(4) a été suivie chez l'Arabidopsis après administration de forte dose de cet amino-acide.

Après fixation dans l'acétone ou inclusion par la technique du "freeze drying", les coupes ont été recouvertes d'émulsion auto-historadiographique et exposées pendant deux mois.

L'examen des coupes, après développement, montre que l'activité est très localisée au niveau des chloroplastes, principalement dans des granules internes rappelant les localisations histochemiques de sucres, amino-acides et phosphatases, et dans des grains périphériques évoquant une adsorption et la traversée de la membrane chloroplastique.

Chez l'Orge, les images obtenues sont du même type (Planche IX). L'examen de l'incorporation en fonction des doses croissantes de leucine a montré les tendances suivantes : à faibles doses, l'activité est surtout cytoplasmique avec marquage des vaisseaux. A doses plus élevées (passage à la phase inhibitrice) la leucine paraît alors pénétrer abondamment dans les chloroplastes : c'est ce qui doit lui permettre de jouer brusquement son rôle inhibiteur.

Il est maintenant permis d'envisager une participation de la leucine aux phénomènes de transport actif des substances à travers les membranes cellulaires, mécanisme faisant intervenir une phosphorylation temporaire, ce qui nous ramène aux notions de poly-enzymes comprenant, en particulier, les phosphatases et ATP^{ase} .

...

A - Etude chez l'Orge
B - Etude chez l'Arabidopsis

A - ETUDE CHEZ L'ORGE

Lumière : 1700 lux température : 25° C
Doses administrées : leucine : 10 µM/cm³ aza-leucine : 10 µM/cm³
Durée du traitement : 13 jours

Les comparaisons Témoins/Leucine/Aza-leucine, sont maintenant présentées de façon juxtaposée. L'incorporation de leucine-¹⁴C sera décrite ensuite.

La leucine et l'aza-leucine inhibent effectivement la formation des pigments (Tableau LXXIX (HT)). Les effets sont plus accentués dans le cas de l'aza-leucine, principalement au niveau des xanthophylles chez les mutants, sur lesquels la leucine a moins d'effet (surtout pour la chlorophylle (b) chez V_2 et V_3).

Les deux modes d'action pourraient donc bien différer : la leucine agissant indirectement par une voie qui pourrait être de type hormonal, et l'aza-leucine en freinant la biosynthèse des caroténoïdes vraisemblablement par compétition avec la leucine.

Les variations observées au niveau des cofacteurs sous l'effet de la leucine et de l'aza-leucine sont encore différentes entre elles dans le cas du tocophéryl-chroménol dans tous les lots, et dans celui du plasto-chroménol chez V₂ et les témoins (Tableau LXXX (HT)). Le toco-chroménol est surtout² diminué par la leucine sauf chez V₃, alors que le plasto-chroménol augmente sous l'effet de l'aza-leucine.

chez V_2 et V_3 et diminue chez V_1 et les témoins.

De plus, la leucine entraîne une formation accrue de p.Q.A. que l'aza-leucine ne fait pas apparaître : dans ce cas, une inhibition de biosynthèse peut être admise ; dans les cas d'augmentation de teneurs en divers chroménols, ce sont des transformations physiologiques à partir de produits déjà existants qui peuvent expliquer ce phénomène.

2°) Amino-acides libres

L'absorption respective de leucine et d'aza-leucine chez les témoins et les mutants présente des particularités intéressantes (Tableau LXXXI (HT)) : l'aza-leucine pénètre de manière relativement uniforme, et il serait intéressant de suivre la relation entre quantité absorbée et quantité administrée. Par contre, la leucine est plus absorbée par le mutant V_1 et moins par V_3 . Cela donne à penser, étant donné les effets observés par ailleurs sur les pigments, que les organismes concernés sont sensibles à des doses différentes. Les mutants V_1 et V_2 , par exemple, pourraient être touchés seulement à partir de doses plus fortes et V_3 à partir de doses plus faibles que les témoins : ce point est en relation avec l'état physiologique des plantes avant le traitement. Cette remarque se traduira de façon très nette à propos d'Arabidopsis.

Si la leucine, après avoir réduit les teneurs pigmentaires, entraîne, chez les témoins, une augmentation prévisible de teneurs en amino-acides libres, il n'en est pas de même chez les mutants, ceux-ci étant déjà, du fait de la mutation, très chargés en composés aminés. Parmi ceux qui continuent, cependant, à s'accumuler sous l'effet de la leucine, figurent : l'arginine, la sérine, l'acide aspartique (V_2 et V_3), la glutamine, la thréonine, l'alanine (de façon très marquée), l'acide γ -amino-butyrique, la proline et la valine (sauf chez V_2). Nous retrouvons là quelques-uns des amino-acides qui ne suivent pas les variations en fonction inverse des teneurs en chlorophylles, et se marquent bien après incorporation d'acétate- $l\text{-}^{14}\text{C}$, ce qui souligne l'aspect physiologique du rôle de la leucine.

L'aza-leucine, par contre, parvient à augmenter encore les concentrations en amino-acides libres, dans les cas où la leucine n'avait pas d'effet notable ; les valeurs comparées chez les plants normaux et mutés montrent une tendance à l'uniformisation. Cependant, la thréonine, l'alanine et l'acide γ -amino-butyrique diminuent partout, ainsi que la valine chez V_1 et V_2 , la méthionine chez V_1 , V_2 , V_3 .

Cette observation montre qu'il ne s'agit pas d'une simple alimentation aminée, mais que l'aza-leucine joue sur le plan physiologique et avec un mécanisme propre, à un niveau voisin de celui de la leucine. Les témoins et les mutants V_2 montrent à nouveau un signe de leur parenté métabolique (déjà vue avec le p.C.M.B.) au niveau de l'asparagine qui s'accumule à la fois sous l'effet de la leucine et de l'aza-leucine. Cette analogie va se retrouver au niveau du saccharose.

3°) Sucres libres

La leucine augmente la concentration en glucose et fructose chez les plants normaux, mais elle a peu d'effet sur les mutants : ceux-ci "savent" peut-être tirer parti des sucres d'une manière différente ; sinon, il faut admettre que leurs chlorophylles ne sont pas aussi fonctionnelles que celles des plants normaux, bien qu'étant guère moins abondantes.

Par contre, l'aza-leucine agit comme la leucine chez les plants normaux, mais entraîne l'accumulation de glucose et fructose chez V_2

...

et V_3 . Les mutants permettent donc, là encore, de saisir une différence de mécanisme.

Le ribose n'est pas concerné dans ces relations physiologiques mais le saccharose s'accroît avec l'aza-leucine chez les témoins et surtout chez V_2 (195 % et 475 % respectivement) (ceci confirme la renté T- V_2 déjà établie).

4°) Incorporation de leucine-(U)- ^{14}C

Le lot de plantes normales et mutées traitées par la leucine a reçu 5 H avant l'extraction, une solution de leucine (U)- ^{14}C présentant les caractéristiques suivantes : $2,5 \mu Ci/cm^3$ et $5 \mu M/cm^3$ (500 $\mu Ci/mM$). Les doses administrées ont été de $0,4 cm^3/cm^3$ de liq. de nutritif.

Les résultats ci-dessous traduisent la comparaison de l'incorporation dans le métabolisme des plantes normales et mutées.

a) Pigments et cofacteurs éthéro-solubles

Le ralentissement du métabolisme pigmentaire s'est traduit par une très faible incorporation non mesurable au niveau des pigments chlorophylliens et des cofacteurs. Le tableau ci-dessous montre, cependant, l'activité en $Ci \times 10^{-15}/mg$ de poids frais retrouvée dans l'extrait lipidique, ainsi que la part revenant aux pigments et cofacteurs totaux et surtout à leurs précurseurs (chlorophyllides, phytoène, porphyrines) qui sont les plus marqués :

	Témoins	V_1	V_2	V_3
Activité totale	11,7	10,1	12,56	20,1
Pigments et Précurseurs	3,7	3,4	6,1	12,1
id. en % du total	31,6	34,6	48,6	60,2

L'incorporation paraît croissante chez les mutants, mais il est difficile d'attribuer une interprétation physiologique à un résultat aussi partiel. Dans le cas de V_3 , une pénétration plus facile de la leucine dans les chloroplastes pourrait expliquer qu'une dose absorbée plus faible que chez les témoins suffise à inhiber la photosynthèse.

b) Amino-acides libres

Les résultats numériques figurent dans le tableau LXXXIII (HT). La leucine se distribue très largement dans les autres amino-acides souvent plus chez V_3 que chez les témoins (comme pour les lipides). Or, les amino-acides libres se localisent souvent dans des granules chloroplastiques et l'hypothèse d'un transfert plus rapide à travers la membrane peut être envisagée. La glutamine est bien marquée alors que l'asparagine, comme avec l'acétate- ^{14}C , est peu marquée par rapport à l'acide aspartique. Cela rappelle la voie de passage de la leucine à l'acétyl-Co A. qui nous ramène effectivement au cas de l'acétate ^{14}C .

c) Sucres libres

La leucine, par voie de dégradation, conduit à former de l'acétyl-CoA- ^{14}C qui peut, à son tour, remonter jusqu'à la synthèse des sucres. Le marquage plus important des sucres des mutants confirme leur voie préférentielle de synthèse à partir de l'acétyl-CoA, plutôt que du cycle de Calvin (Tableau LXXXIV (HT)). En première approximation,

par comparaison avec les plants normaux, la part de sucres d'origine photosynthétique serait au maximum la suivante, chez les mutants :

Sucres Photosynthétisés	Témoins (en référence)	V ₁	V ₂	V ₃
Glucose	100 %	50 %	33 %	25,4 %
Fructose	100 %	75 %	50 %	38,5 %

La part du fructose est la plus importante, puisque sa synthèse est effectuée la première. Cette fraction photosynthétique diminue progressivement avec la viabilité des mutants, ce qui confirme le décalage entre les teneurs totales en chlorophylles et la fraction réellement efficace (qui peut varier notablement chez les témoins).

B - ACTION CHEZ ARABIDOPSIS

Le rôle de la leucine et de l'aza-leucine a été étudié chez les plants normaux d'Arabidopsis. Les paramètres expérimentaux sont les suivants :

Lumière : 3000 lux - température : 23° C
Doses administrées : 1,9 µM/plant/1,5 µM/cm²
Durée des traitements : Aza-leucine : 3 jours leucine : 6 jours
Administration de leucine-(U)-¹⁴C (même solution que précédemment)
(5H avant extraction)

Le poids moyen des plants au moment de l'extraction est indiqué ci-dessous :

{	normaux	: 8,4 mg
	+ leucine	: 5,8 mg
	+ aza-leucine	: 3 mg

1°) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

L'aza-leucine agit beaucoup plus vite que la leucine, mais dans les deux cas, les chlorophylles, le carotène et la néo-xanthine sont réduits, alors que la lutéine et la viola-xanthine augmentent. (Tableau 39). Cette réaction constitue, peut-être une parade devant l'affaiblissement de la photosynthèse. Les composés les plus marqués sont le β-carotène, la viola-xanthine et la chlorophylle (a).

Au niveau des cofacteurs, les formes actives de chroménols se retrouvent en quantités accrues après action de la leucine et de l'aza-leucine, ce qui pourrait être compatible avec une réaction de défense de l'organisme (Tableau LXXXV (HT)). Le plasto-chroménol n'est pas marqué par la leucine-¹⁴C, tandis que le tocophéryl-chroménol montre une activité spécifique deux fois plus importante que le chroménol-forme 2.

Tableau (39) - Comparaison des teneurs pigmentaires des plants normaux et mutés après action de la leucine et de l'aza-leucine (doses toxiques) (nM/mg)

Composés analysés	Témoins				Mutants	
	Culture Normale	+ leucine ¹⁴ C		+ Aza leucine	Culture Normale	+ leucine
	teneurs nM/mg	teneurs nM/mg	Act. Sp. 10 ⁻¹² Ci/nM	teneurs nM/mg	teneurs nM/mg	teneurs nM/mg
Chlor. (a)	0,674	0,578	42,9	0,413	0,283	0,283
Chlor. (b)	0,362	0,268	10,3	0,281	0,135	0,135
Phéophyt.	0,0	0,039	-	0,185	-	-
Carotène	0,144	0,133	168,6	0,128	0,105	0,105
Lutéine	0,235	0,267	16	0,266	0,106	0,106
Violaxanthine	0,108	0,124	79	0,137	0,040	0,040
Néoxanthine	0,0673	0,0626		0,060	0,027	0,027

STRUCTURE DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS ET CAROTENOÏDES D'ARABIDOPSIS THALIANA APRES INCORPORATION CELLULAIRE D'AZA-LEUCINE

Divers travaux ont montré que la leucine peut participer à la biosynthèse des pigments (64) et nos propres expériences l'ont bien confirmé.

L'aza-leucine pouvant jouer un rôle inhibiteur de la synthèse des caroténoïdes (et des chaînes chlorophylliennes) par compétition avec la leucine, nous avons voulu vérifier si, en outre, les pigments synthétisés en présence de l'aza-leucine ne présentent pas d'anomalie de structure.

Le comportement en chromatographie sur couche mince et l'étude des spectres des divers pigments isolés et purifiés, après action de l'aza-leucine, n'a permis de déceler aucune modification par rapport aux pigments-témoins. Si l'aza-leucine s'incorpore dans les pigments, seule une partie de la molécule, identique à son homologue dans la leucine, doit être utilisée, ou bien, l'aza-leucine n'est pas impliquée du tout dans la synthèse. Ceci pourrait être vérifié avec les molécules marquées.

2°) Amino-acides libres

Les amino-acides s'accumulent dans les plants traités à la leucine et encore plus après action de l'aza-leucine (tableau LXXXV (HT)). Cette réaction est parallèle à la chute des teneurs pigmentaires qui est plus rapide sous l'action de l'aza-leucine. Les seu-

les exceptions sont l'alanine (par l'aza-leucine) et l'acide γ amino-butyrique (par la leucine). Ces amino-acides, qui réagissaient aussi de cette façon chez l'Orge, font partie de ceux qui ne suivent pas les variations en sens inverse de celles observées pour les chlorophylles.

Le marquage par la leucine ^{14}C est important, principalement pour les amino-acides basiques.

3°) Sucres libres

L'inhibition de la photosynthèse se traduit au niveau des sucres par une augmentation générale des teneurs, mais beaucoup plus prononcée en ce qui concerne le maltose, en particulier avec l'aza-leucine (60 fois). Par contre, l'aza-leucine ne fait pas autant augmenter le glucose et le fructose que la leucine (Tableau LXXXVII (HT)).

L'accumulation de fructose par rapport au glucose semble témoigner d'un effort métabolique pour compenser un défaut photosynthétique.

La formation de sucres à partir de la voie de la glycolyse en sens inverse paraît active, également, chez Arabidopsis car le marquage des sucres est important. Du fait de la vitesse des réactions métaboliques d'Arabidopsis, le marquage a déjà eu le temps de passer en majorité au glucose alors que le fructose était le plus radioactif chez l'Orge, au bout de 5H.

CHAPITRE III

ACTION DE LA L-LEUCINE SUR LA STIMULATION DU VERDISSEMENT DES PLANTS D'ORGE ET D'ARABIDOPSIS NORMAUX ET MUTES

Après avoir examiné les effets inhibiteurs de la leucine sur les pigments photosynthétiques des plantes normales et mutées, nous allons vérifier la réalisation de la phase d'activation chez les mutants d'Orge et d'Arabidopsis. Nous aborderons donc successivement :

- A - Etude de l'Orge
- B - Etude chez l'Arabidopsis
(avec incorporation de leu-¹⁴C)

A - ETUDE CHEZ L'ORGE

Les plants normaux et viridis ont été cultivés dans les conditions suivantes :

lumière : 1700 lux 15 H sur 24 - température : 21° C
leucine administrée : concentration 4 $\mu\text{M}/\text{cm}^3$
durée du traitement : 10 jours

Sur le plan morphologique, nous n'avons pas relevé de différences dans la vitesse de croissance des divers lots au cours du traitement.

Par contre, les analyses biochimiques ont montré d'importantes variations qui vont être examinées maintenant.

1°) Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Ces résultats montrent que la leucine est capable d'induire une augmentation de teneurs en pigments chlorophylliens chez tous les mutants. L'effet se traduit même chez V_3 par une disparition de la phéophytine, signe particulier de santé pour la plante au point de vue photosynthétique. Seules les xanthophylles varient peu chez V_3 , mais les teneurs étaient déjà maximales dans les conditions de l'expérience et n'ont pu augmenter plus. La relative faiblesse de nouveau pigmentaire des témoins est due au manque d'homogénéité des graines de notre lot initial d'étude.

L'amplitude des variations observées est souvent plus forte chez les mutants que chez les témoins, en ce qui concerne les chlorophylles ce qui marque un rattrapage plus grand à réaliser, sur le plan photosynthétique.

Tableau (40) - Variations de teneurs en pigments chlorophylliens sous l'action de la leucine à faible dose chez les plants d'Orge normaux et mutés (nM/mg)

Composés	Témoins		V ₁		V ₂		V ₃	
	N	Leu	N	Leu	N	Leu	N	Leu
Chloroph. (a)	0,90	1,1	0,91	1,16	0,74	0,94	0,948	1,276
Chloroph. (b)	0,420	0,51	0,42	0,568	0,31	0,42	0,423	0,573
Chlorophyllines	0	0	0	0	0	0	0,030	0
Protéine	0,186	0,192	0,153	0,181	0,144	0,160	0,185	0,234
Stéine	0,306	0,387	0,34	0,34	0,26	0,290	0,326	0,333
Polaxantine	0,150	0,228	0,158	0,218	0,132	0,169	0,179	0,183
Xanthine	0,062	0,087	0,050	0,074	0,053	0,048	0,066	0,0603

Les cofacteurs voient leurs teneurs augmenter dans tous les cas, aussi bien pour les formes actives de chroménol que pour la forme de réserve (Tableau LXXXVIII (HT)). C'est donc plutôt le déséquilibre entre ces diverses formes ou leur carence qui caractériseront les troubles à ce niveau. La plastoquinone-A augmente surtout pour V₁ et V₃.

En définitive, une dose de leucine choisie dans la phase d'activation permet donc bien d'élever de 20 à 30 % le niveau des teneurs pigmentaires des mutants d'Orge de type viridis.

Cela montre, cependant, que ces mutants se situaient initialement à un degré d'altération encore assez faible pour que le système pigmentaire chloroplastique puisse reprendre sa différenciation vers l'état normal. La question se pose donc pour des mutants de type Xantha et Albina. Parmi les mutants que nous avons étudiés dans la première partie, tous, même le Xantha M₅, peuvent contenir des chlorophylles (en lumière atténuée dans ce cas) sauf le mutant M₆ qui n'en forme jamais : M₆ a certainement atteint un degré irréversible de différenciation biochimique par rapport aux plants normaux.

2° Amino-acides libres

La leucine absorbée alimente le métabolisme aminé et entraîne une augmentation de teneur en de nombreux amino-acides libres (Tableau LXXXIX (HT)). La sérine et l'acide γ -amino-butyrique diminuent chez les mutants, de même que la valine. L'asparagine décroît chez V₃, signe de ré-utilisation de la forme de réserve et de restauration d'un métabolisme actif.

3° Sucres libres

Les teneurs en sucres augmentent et tendent vers des valeurs voisines chez les mutants et les témoins, sauf V₂ pour le fructose (Tableau XC (HT)). Le sens des variations est le même partout.

...

En résumé, la leucine absorbée par les mutants induit des variations métaboliques qui tendent, de façon générale, à limiter les différences avec les plants normaux. Cependant, les mutations chlorophylliennes peuvent avoir des causes relativement indépendantes du rôle de régulation de la leucine et ne subir qu'une amélioration apparente du système photosynthétique dans la limite de la phase d'activation.

B - ETUDE CHEZ Arabidopsis

Les plants normaux et viridis d'Arabidopsis ont été soumis à des doses faibles de leucine. Les mutants ont, également, reçu de l'iso-leucine dont la carence a été démontrée au chapitre I de la première partie de ce travail.

Les doses administrées sont de : 0,86 μM /plant - 0,8 $\mu\text{M}/\text{cm}^3$

La durée du traitement est de : 12 jours

Un lot de mutants a été maintenu 18 jours en présence de leucine afin de montrer l'effet d'une application prolongée.

L'âge des plants à l'extraction, au stade d'apparition des hampe est ici de 19 jours pour les témoins et de 24 jours pour les mutants.

Les mutants ont reçu de la leucine-(U)- ^{14}C (solution à 2,5 μCi et 5 $\mu\text{M}/\text{cm}^3$) à raison de 1 cm^3 pour 20 plantes dans 40 cm^3 de liquide nutritif, 5H avant extraction. Les activités spécifiques sont indiquées après les résultats biochimiques, avec rappel des valeurs obtenues chez les témoins précédemment ($\times 10^{-15}$ Ci/nM)

1° Pigments chlorophylliens et cofacteurs

Tableau (41) - Variations des teneurs en pigments chlorophylliens après action de la leucine à faible dose dans les rosettes d'Arabidopsis normales et mutées (nM/mg)

Pigments	Témoins	T. + Leu.	Mutants	M.+leu(12j)	M.+leu(18j)
Chlorophylle (a)	1,01	1,13	0,403	0,445	0,49
Chlorophylle (b)	0,59	0,70	0,174	0,210	0,22
Carotène	0,207	0,25	0,125	0,130	0,16
Lutéine	0,39	0,44	0,123	0,156	0,16
Violaxanthine	0,186	0,24	0,067	0,091	0,11
Néoxanthine	0,112	0,143	0,033	0,036	0,05

Les teneurs en tous les pigments augmentent à la fois chez les plants normaux et chez les mutants pour lesquels l'accroissement se poursuit après un traitement prolongé.

Les témoins placés en conditions d'inhibition ont leurs chlorophylles moins marquées que celles des mutants placés en conditions d'activation par la leucine, dont l'effet semble donc se traduire

ainsi dans la vitesse du métabolisme des pigments (Tableau XCI (HT)). Le carotène et la viola-xanthine, cependant, sont plus marqués chez les plants normaux, même inhibée : ce résultat est compréhensible, car les caroténoïdes ont été peu sensibles aux doses fortes de leucine, et ont quelquefois augmenté de teneur (lutéine, viola-xanthine) alors que les chlorophylles baissaient.

Lorsque le contact avec la leucine ^{14}C est prolongé, le marquage augmente jusqu'à atteindre des valeurs assez uniformes pour les caroténoïdes et très voisines pour les chlorophylles, qui sont ainsi tous parvenus au maximum d'incorporation de ^{14}C . Il faut souligner le marquage lent de la chlorophylle (b) par rapport à la chlorophylle (a), comme cela avait été observé en présence d'acétate- ^{14}C . Ceci apporte un argument de plus à la thèse de l'ordre de formation de ces deux pigments (de (a) à (b) successivement)(216a)(216b)(60a).

Tableau (42) - Variations de teneurs en cofacteurs après activation de l'équipement chlorophyllien par la leucine dans les rosettes d'Arabidopsis normales et mutées (nM/mg)

Composés	Témoins	T. + Leu. 12 j	Mutants	M.+Leu/Ileu 12 j	M.+Leu/Ileu 18 j
Tocophéryl-Chroménol	3,87	4,45	4,12	2,74	13
Chroménol-2	1,42	2,07	1,92	1,22	12
Chroménol-3	0,84	0,93	1,04	0,66	4,2
Plasto Chroménol	2,11	3,02	2,96	3,35	1,13

Le rétablissement du système pigmentaire lié à la phosphorylation est, ici, particulièrement démonstratif, puisque les chroménols qui s'accumulaient chez les mutants sont ramenés à des valeurs inférieures sous l'action de la leucine. Le plasto-chroménol augmente d'abord dans tous les cas, mais il diminue à nouveau après traitement prolongé au profit des formes actives.

Les mesures radiochimiques ont montré que ces formes actives de chroménols sont plus marquées que la forme plasto-chroménol après 5 H de contact avec la leucine- ^{14}C (Tableau XCII (HT)). Ce résultat est inversé au bout de 6 jours.

2°) Amino-acides libres

Comme chez l'Orge, nous obtenons une augmentation de teneur pour la plupart des amino-acides. Les mutants réagissent de la même façon ou quelquefois, en sens inverse, mais toujours dans le sens d'un rapprochement vers les valeurs normales (Tableau XCIII (HT)). C'est le cas, en particulier, de la proline et de l'acide α amino-butérique.

Il est également important de constater ici encore, que les mutants absorbent beaucoup plus de leucine, en phase d'activation, que les témoins, pour un résultat comparable au point de vue répercussions sur l'ensemble du métabolisme. La courbe des doses correspondant aux phases d'activation et d'inhibition doit donc être fortement décalée vers les hautes concentrations, dans le cas des mutants.

Cette observation permet d'expliquer les résultats d'une récente expérience de KASYANENKO et NASYROV, 1970 (124) : ces auteurs, recherchant systématiquement l'effet d'acides aminés sur le reverdissement de mutants d'*Arabidopsis* ont obtenu un seul cas de réponse positive : grâce à la leucine sur un virido-albina. Les auteurs ont conclu au reverdissement sur la base suivante :

Pigments (mg/g)	Témoins	T. + Leucine	Mutants	M. + Leucine
Chlorophylle (a)	0,91	0,58	0,22	0,53
Chlorophylle (b)	0,29	0,24	0,127	0,258
Lutéine	0,089	0,076	0,028	0,073
Violaxanthine	0,039	0,034	0,020	0,048
Carotène	0,052	0,050	0,020	0,049

(Données numériques de KASYANENKO et NASYROV, 1970 (124))

Ces chiffres montrent une réaction typique où la leucine, à raison de 200 mg par litre, provoque une activation chez les mutants, mais se situe déjà dans la zone inhibitrice pour les témoins, ce qui entraîne une convergence des chiffres. Ce phénomène n'a pas été mentionné par les auteurs, le double rôle de la leucine n'ayant pas encore été décrit, à notre connaissance. Ce mécanisme est très important pour les expériences d'analyse nutritionnelle et, peut-être même, dans le domaine pharmacologique, au niveau cellulaire.

3°) Sucres Libres

Comme dans le cas des autres métabolites étudiés, les variations observées au niveau des sucres chez les mutants tendent à rapprocher leurs teneurs des valeurs normales, y compris dans le cas du fructose qui baisse chez les témoins et augmente chez les mutants (Tableau XCIII (HT)). Seul, le maltose est en excès chez ces derniers. Son incorporation, dans des formes de réserve, n'est sans doute pas aussi rapide que dans le cas des témoins (Tableau XCIV (HT)).

Le marquage des sucres est important, d'un ordre de grandeur voisin de celui de nombreux acides aminés (Tableau XCIV (HT)).

En définitive, chez l'Orge comme chez l'*Arabidopsis*, la leucine peut exercer un effet de régulation sur les teneurs en pigments chlorophylliens qui se répercute sur le métabolisme des sucres et des acides aminés. La connaissance de ce mécanisme nous a permis d'induire un verdissement accru de tous les mutants étudiés. L'effet de stimulation ou d'inhibition est lié à la concentration dans les chloroplastes et le problème du transfert de leucine à travers la membrane chloroplastique revêt, alors, une grande importance. Les théories sur le mécanisme de passage des métabolites sous une forme transitoire phosphorylée (179), nous amène donc à revenir sur le cas des phosphatases.

...

CHAPITRE IV

EFFETS DE LA LEUCINE ET DE L'AZA-LEUCINE SUR L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ALCALINE DE L'ORGE (NORMAUX ET MUTES)

A - Rôle de la leucine : influence de la dose

- 1° Expériences in vivo
- 2° Expériences in vitro
- 3° Etude histochimique

B - Mécanisme d'inhibition de l'activité phosphatasique par la leucine in vitro

C - Effets de la leucine et de l'aza-leucine in vivo sur l'activité phosphatasique de plants normaux et mutées

D - Etude histochimique du rôle de la leucine sur l'acti- vité phosphatasique ATPasique

- 1° Phosphatases alcalines
- 2° ATPases alcalines

INTRODUCTION

La Bibliographie a souligné, d'une part, l'importance des amino-acides libres vis à vis de l'appareil photosynthétique, et d'autre part, leur rôle possible vis à vis de l'activité phosphatasique alcaline. Or, nos recherches ont fait apparaître plus particulièrement la leucine comme un effecteur susceptible de participer à la régulation du fonctionnement de l'appareil photosynthétique, et il convient de rappeler que l'analyse des mutants d'Arabidopsis a permis de déceler une augmentation d'activité phosphatasique alcaline associée à une teneur anormalement peu élevée en leucine (et iso-leucine).

Ces divers éléments, associés à la présence simultanée de leucine et de phosphatases concentrées dans des granules chloroplastiques nous ont conduit très vite à rechercher le rôle précis de la leucine sur les phosphatases elles-même, dans l'optique du mécanisme d'action sur l'appareil photosynthétique par la voie de la photophosphorylation.

...

A - ROLE DE LA LEUCINE : INFLUENCE DE LA DOSE

Les expériences ont été effectuées à partir de témoins d'Orge

1°) Expériences in vivo

Pour une concentration en substrat de $3,7 \cdot 10^{-3} M$ (pNPP) et une concentration en extrait (plants adultes) correspondant à 200 mg/cm³ de tampon, nous avons obtenu les premiers résultats après 24 H de traitement sur des plants excisés (Tableau XCIV (HT)).

L'activité, dans les plantes ayant reçu des doses croissantes de leucine, augmente avec les faibles doses, puis, diminue pour remonter à dose très élevée (Tableau XCV (HT)). Ces observations peuvent, cependant, traduire soit un effet de l'acide aminé sur la cinétique enzymatique, soit un effet de type inducteur ou répresseur.

2°) Expériences in vitro

La leucine a été introduite dans les micro-cuves, avec le substrat, avant la réaction. Son effet s'exerce alors sur la cinétique d'activité de l'enzyme. Les résultats numériques (Tableau XCVI (HT)) sont explicités par la figure (34)

Ces résultats confirment la possibilité d'activation de la phosphatase par les faibles doses de leucine, puis le passage à une inhibition progressive à doses plus élevées. L'inhibition semble proportionnelle au log de la dose (la corrélation est très élevée : $\rho = 0$ et l'extrapolation de la droite de régression : $V_i = -9,545 \log ([\text{leu}] \times 100) + 36,143$ donne une inhibition de 100 % pour $[\text{leu}] \approx 60 M$, dose impensable sur le plan biologique.

L'activation obtenue par action de la leucine in vivo, peut être supprimée par elle-même in vitro, à dose convenable à partir du même extrait (Tableau XCVII (HT)). Une des possibilités serait l'induction par la leucine in vivo, d'une synthèse protéique spécifique, se traduisant par une concentration enzymatique, ou le déclenchement d'un mécanisme de libération de type zymogène $\rightarrow$ enzyme, l'enzyme apparue étant ensuite inhibée par action directe de l'acide aminé. Ce dernier mécanisme a particulièrement retenu notre attention (paragraphe B)

3°) Etude histochimique

L'activité phosphatasique et ATP^{asique} a été étudiée au niveau cellulaire, sur des feuilles d'Orge provenant des expériences in vivo précédemment décrites.

L'activité est essentiellement localisée dans les chloroplastes (zones internes ou le long de la membrane). Elle est parfois présente dans le liber, mais à un degré bien moindre. En lumière normale, les variations sont peu visibles, mais, en lumière atténuée, l'activité augmente avec la concentration en leucine et se trouve plus importante qu'en lumière normale (ce qui confirme les résultats de dosage...

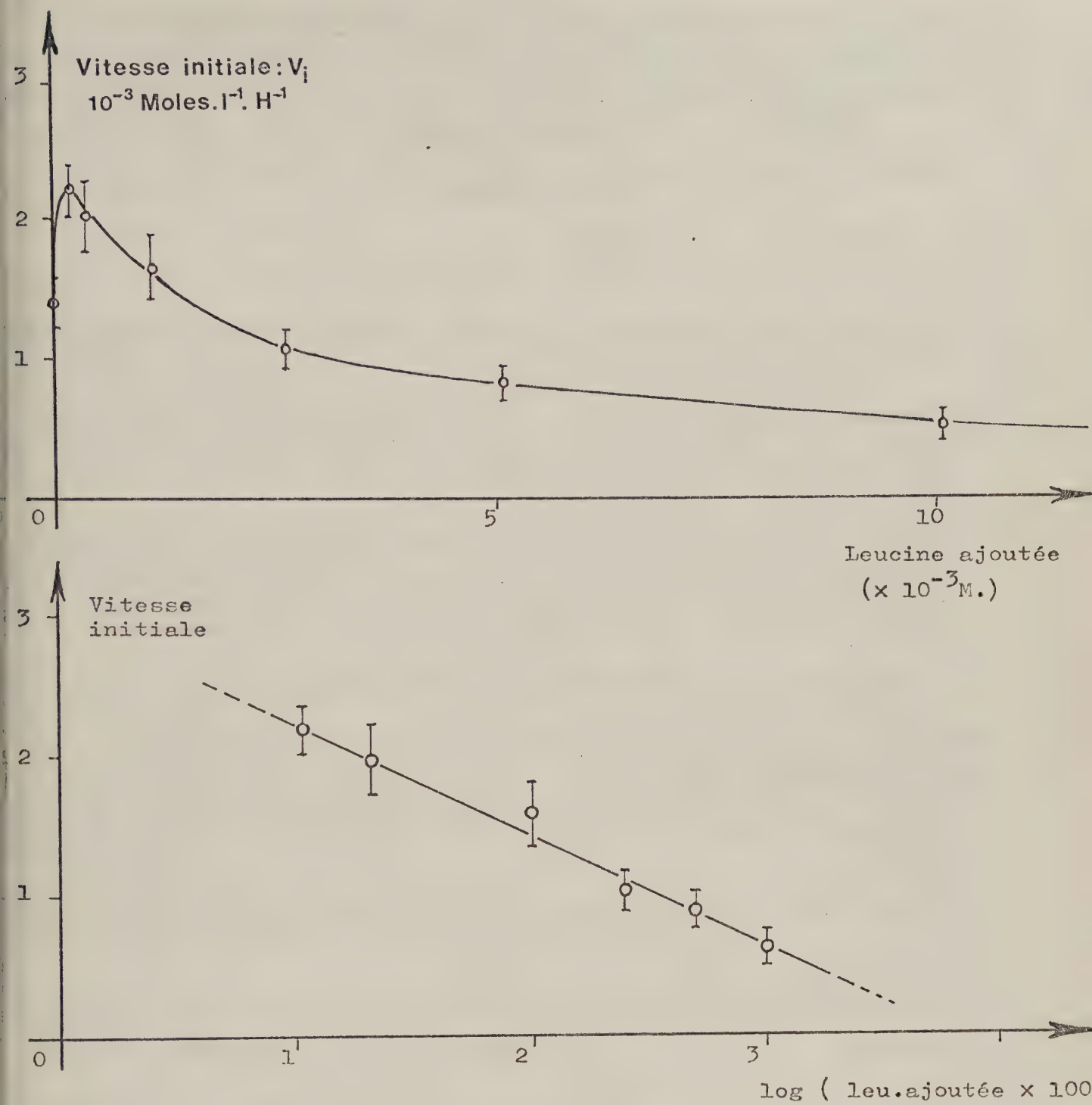


Fig. (34) - Variation de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en inhibiteur : représentations en coordonnées normales et semi-logarithmiques.

ges) ; elle peut alors diffuser également vers le cytoplasme.

Par voie biochimique, nous avons obtenu les résultats suivants

[leu]	Vi lumière normale	Vi lumière atténuée
0	$1,29 \cdot 10^{-3}$ Moles/l/H	2,25
$30 \cdot 10^{-3} M$	0,825 " "	1,062

En lumière atténuée, l'activité augmente, même à partir d'un état d'inhibition par la leucine.

L'ATP^{ase} alcaline est également bien localisée dans les chloroplastes. En lumière normale, elle augmente pour les doses 30 et $80 \cdot 10^{-3} M$. Par contre, en lumière atténuée, elle diminue en fonction des doses de leucine croissantes, mais présente également une diffusion vers le cytoplasme.

La leucine semble donc pouvoir jouer simultanément de façon opposée sur la Phosphatase et l'ATP^{ase} et favoriser la diffusion de l'enzyme vers le cytoplasme en lumière atténuée, ce qui aurait pour effet de protéger l'ATP en lumière atténuée. (Rappelons que l'atténuation de lumière enrichit les chloroplastes en leucine).

B - MECANISME D'INHIBITION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE PAR LA LEUCINE IN VITRO

La courbe de Michaelis a été déterminée en présence de leucine à la concentration de 2,5 M. L'expérience a été renouvelée en utilisant l'aza-leucine à la même concentration. La constante Km a été déterminée d'après la droite de LINEWEAVER et BURK (calcul de régression).

Tableau (44) - Vitesse maximum ($\times 10^{-3}$ Moles/l/H) et Constante de Michaelis (Moles/l $\times 10^{-3}$) de la phosphatase en présence de leucine et aza-leucine

Extraits	$V_M (\times 10^{-3})$ Moles/l.H.	$K_m (\times 10^{-3} M)$	Pente (*)	Coef. de Corrélation(*) ρ
Témoins	$3,38 \pm 0,19$	$12,02 \pm 1,06$	3,56	0,99
T + LEU.	$3,40 \pm 0,42$	$19,15 \pm 6$	5,64	0,98
T + Aza-leucine	$4,69 \pm 0,8$	$19,4 \pm 7,2$	4,14	0,99

(*) Droite de Lineweaver et Burk

La fig. (VII (HT)) représente les courbes directes et inverses avec, en pointillés, la courbe normale pour les témoins.

L'examen des chiffres du tableau (44) pourrait donner à penser que la leucine est un inhibiteur compétitif pur de l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge (V_M inchangée, K_m augmentée). Cependant, la comparaison des courbes expérimentales aux courbes théoriques tracées d'après l'équation de MICHAELIS et MENTEN :

$$\text{Vitesse de réaction : } V = \frac{V_M \cdot [S]}{K_m + [S]}, \text{ apporte un élément nouveau.}$$

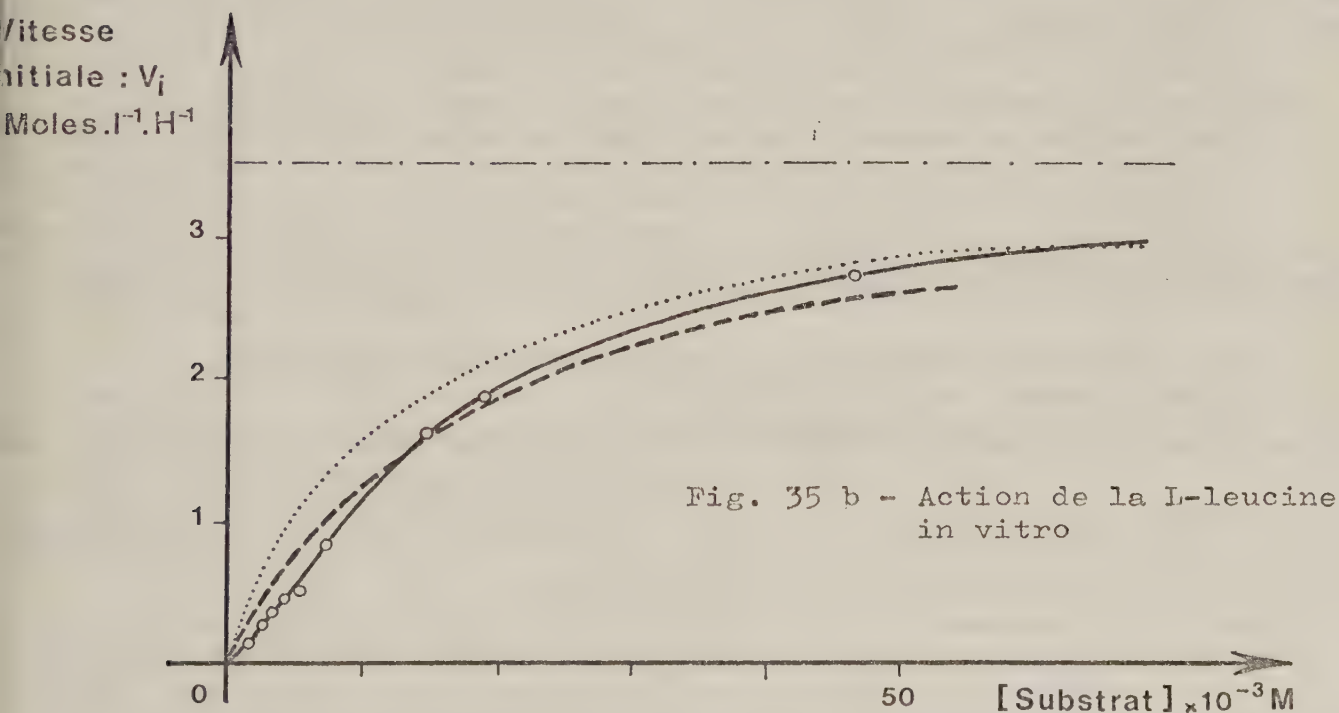
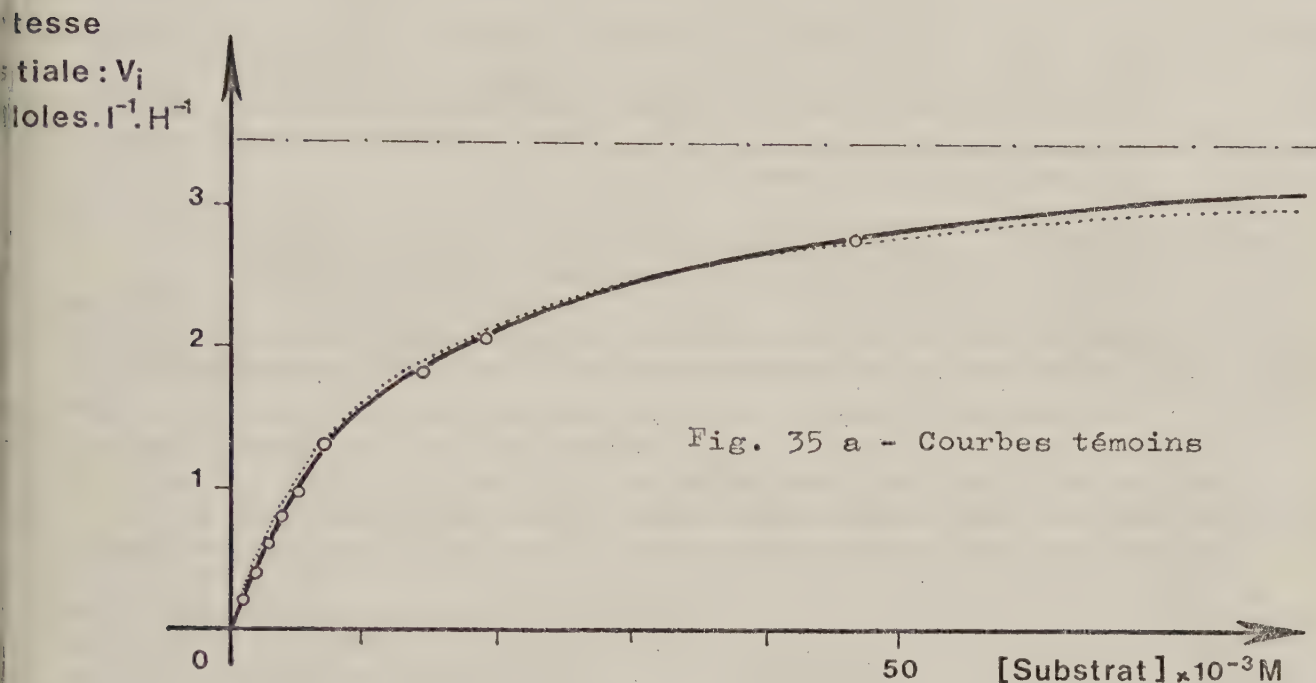


Fig. 35 - Variation de la vitesse d'activité phosphatasique alcaline chez l'Orge en fonction de la concentration en substrat : comparaison des courbes expérimentales (—○—) et des courbes théoriques : témoins (.....) et avec leucine (---)

Dans l'extrait témoin, les courbes théorique et mesurée coïncident très bien (fig. 35 a), mais dans le cas de l'inhibition par la L-leucine (fig. 35 b), la courbe expérimentale présente une allure sigmoïdale qui pourrait traduire un mécanisme allostérique

L'aza-leucine, par contre, entraîne une augmentation de la vitesse maximum et la valeur de Km est alors la même que dans le cas de l'inhibition par la leucine : ceci correspondrait théoriquement à la levée d'une inhibition non compétitive pure par rapport un complexe [Enzyme-leucine] déjà existant dans l'extrait. Dès lors, trois conclusions semblent pouvoir être tirées :

- Le site de fixation de l'aza-leucine (en tant qu'activateur) est différent de celui de la leucine (en tant qu'inhibiteur) sur la protéine enzymatique. Ces deux effecteurs témoignent vis à vis de l'enzyme de la même affinité (différente de celle du substrat phosphorylé)
- La leucine pré-existe, comme inhibiteur naturel, dans notre extrait enzymatique brut.
- L'antagonisme entre leucine et aza-leucine se traduit par la libération apparente d'une activité enzymatique supplémentaire (accroissement du nombre de sites actifs disponibles).

L'activité mesurée chez les plants normaux doit donc se situer à un stade d'équilibre entre activation et inhibition, cet équilibre pouvant être déplacé dans un sens ou dans l'autre selon les conditions physiologiques. Ces différents mécanismes restent compatibles avec un processus de régulation de type allostérique. Il convient de rappeler, cependant, que de récents travaux sur le rôle inhibiteur de la phényl-alanine (71) et sur le mécanisme d'action de la phosphatase alcaline (140) tendent à conclure à un mécanisme en deux étapes de formation du complexe enzyme-substrat avant sa dissociation. En particulier, une phosphorylation pourrait intervenir selon l'équation : $E + S \rightleftharpoons ES \xrightleftharpoons{P} ESP \rightleftharpoons E + \text{Produits}$. Selon FERNLEY (71) c'est seulement avec le complexe ESP que la phényl-alanine formerait une association irréversible. En ce qui concerne la leucine et l'aza-leucine, c'est peut-être aussi à ce niveau qu'il faudrait chercher la différence d'action, l'un des deux agissant sur le complexe initial ES et l'autre sur ESP par exemple. Il n'est d'ailleurs pas exclu que les deux étapes de la réaction puissent être soumises au mécanisme allostérique avec, chaque fois, modification de la configuration des sites d'activation et d'inhibition.

C - ETUDES IN VIVO SUR LES PLANTES NORMALES ET MUTÉES

1°) Activité phosphatasique dans les plantes normales et mutées

Les paramètres V_m , Km, pente de la droite de LINEWEAVER et BURK et coefficient de corrélation sont indiqués ci-dessous. Ils correspondent à des cultures en conditions normales : 1800 ± 100 15 H sur 24, à 21°C. (Tableau (45)).

Les mutants V_1 présentent une activité dont les paramètres sont pratiquement égaux à ceux des témoins. La vitesse maximum est, par contre, plus élevée chez V_2 et plus faible chez V_3 ; dans ce dernier cas, la constante de Michaelis n'est pas significativement différente de celle des témoins. La phosphatase de V_3 en conditions normales se présente comme sous l'effet d'une inhibition non compétitive alors que V_2 est activée. L'inhibiteur non compétitif ne peut pas être l'aza-leucine qui n'existe pas à l'état naturel, mais pourrait être soit une molécule lui ressemblant sur le plan stérique, soit un autre effecteur allostérique.

Tableau (45) - Paramètres d'activité phosphatasique des plants d'Orge normaux et mutés

Extraits	V_M	K_m	Pente	ρ
	$\times 10^{-3}$ Moles/l/H	$\times 10^{-3}$ M		
Témoins	$3,37 \pm 0,19$	$12,02 \pm 1,06$	3,56	0,99
V_1	$3,23 \pm 0,22$	$11,6 \pm 1,5$	3,59	0,99
V_2	$4,27 \pm 0,45$	$16,93 \pm 3,6$	3,97	0,99
V_3	$2,61 \pm 0,14$	$10,0 \pm 1,03$	3,84	0,99

2°) Effets de la leucine et l'aza-leucine in vivo sur l'activité phosphatasique des plants normaux et mutés

Toutes conditions égales par ailleurs, les plantes ont été mises en présence de leucine et aza-leucine pendant les temps suivants :

Témoins : 8 jours, V_1 : 7 jours, V_2 : 5 jours, V_3 : 6 jours

Les résultats numériques (Tableau XCVIII (HT)) constituent un ensemble complexe dont voici les traits essentiels :

a) Plants normaux (fig. VII (HT))

La leucine in vivo augmente l'activité phosphatasique (V_M), mais conserve la constante K_m des plants normaux : ce qui correspond à une activation : soit par la levée d'un état d'inhibition non compétitive, soit à l'induction d'une synthèse accrue d'enzyme.

L'aza-leucine inhibe l'activité en réduisant aussi K_m , ce qui traduit une plus grande affinité entre l'enzyme et le substrat.

b) Mutants V_1 (fig. VIII (HT))

La leucine augmente ici aussi la vitesse initiale, mais la constante K_m est aussi augmentée, ce qui indique une réduction de l'affinité enzyme-substrat.

L'aza-leucine réduit fortement V_M ainsi que K_m dont la valeur est alors la même que lors de l'application aux plants normaux.

La pente de la droite : témoins + aza-leucine, est identique à celle de V_1 + leucine.

c) Mutants V_2 (fig. IX (HT)).

La leucine, dans ce cas, réduit fortement la vitesse maximum qui était plus élevée que dans le cas des témoins. La valeur de K_m correspond à celle obtenue avec l'aza-leucine chez les plants normaux et V_1 .

L'aza-leucine réduit un peu moins la vitesse maximum, mais augmente considérablement l'affinité enzyme-substrat ($K_m = 7,86$)

d) Mutants V_3 (Fig. X (HT)).

La leucine et l'aza-leucine augmentent la vitesse maximum et la valeur de K_m , qui, dans le cas de l'aza-leucine, rejoint le niveau des plants normaux.

e) Relations de régulation entre témoins et mutants

La leucine est capable, selon les doses, d'activer ou d'inhiber l'activité phosphatasique. Or, les mutants et les témoins placés dans les conditions normales contiennent des phosphatases dont le niveau d'activité est déjà conditionné par leur état métabolique. Les teneurs en leucine, aux âges des plants étudiés, doivent être peu différentes et les teneurs en iso-leucine doivent croître de V_1 à V_3 par rapport aux témoins.

Les relations de pénétration de la leucine dans le cytoplasme puis le chloroplaste, ont montré qu'il faut une plus grande quantité absorbée par les mutants, pour obtenir un effet inhibiteur : à quantité totale égale, certains mutants risquent donc d'être moins riches que les témoins, à l'échelle du chloroplaste.

Ainsi, V_2 serait déjà situé en phase d'activation de l'enzyme et l'addition² de leucine entraînerait un passage aux conditions d'inhibition.

Par contre, le mutant V_3 , subissant un effet inhibiteur d'origine encore non déterminée, voit son activité rétablie par l'addition de leucine selon un mécanisme rappelant l'action de l'aza-leucine in vitro chez les témoins.

Les analyses complémentaires effectuées sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour les dosages enzymatiques (tableau XCIX (HT)) ont montré que dans ces deux cas, l'équipement pigmentaire est amélioré. Il apparaît, aussi chez V_3 , par la même occasion, que l'augmentation d'activité coïncidant avec le traitement par l'aza-leucine s'avère nuisible aux pigments chlorophylliens, alors que c'est une diminution d'activité qui produit le même effet chez les témoins et chez V_1 .

En résumé, l'activité phosphatasique semble devoir se situer à un niveau d'équilibre voisin de celui des plants normaux, pour que les pigments photosynthétiques soient normalement distribués. Une variation en plus ou en moins, entraîne un trouble, alors que réciproquement, une teneur excessive ou trop faible, après rétablissement vers la normale, entraîne une amélioration des teneurs pigmentaires.

La leucine participe étroitement à ce mécanisme, en agissant de plusieurs façons différentes, directement ou indirectement :

- α) effet direct par inhibition compétitive à forte dose ou activation à faible dose
- β) effet indirect par action sur la photosynthèse : l'accumulation provoquée de dérivés phosphorylés, à très forte dose, peut induire une synthèse enzymatique de novo destinée à dégrader les cellules de ces métabolites mal utilisés. C'est, effectivement, ce qu'a montré l'étude de l'influence des doses in vivo chez les témoins (nouvelle remontée au-delà du seuil d'inhibition)
- γ) le passage même de la leucine à travers les membranes pour impliquer un processus de phosphorylation réversible nécessitant l'action d'une phosphatase. L'hypothèse du rôle de la leucine se trouve renforcée par certaines observations pharmacologiques attribuant à cet amino-acide un rôle insulinique, c'est-à-dire, une action dans la phosphorylation réversible des sucres pour leur transfert à travers les membranes (hépatiques puis rénales)(52)(84).

Signalons, enfin, que d'autres amino-acides pourraient participer à ce mécanisme. Il existe peut-être des phénomènes de synergie ou d'antagonisme dont les effets contribuent encore à la régulation de la photosynthèse dans la plante, par l'intermédiaire de la phosphorylation. Ce problème constitue à lui seul un sujet de recherches extrêmement vaste, mais certainement fructueux : ainsi, les mutants d'Arabidopsis qui verdissent en présence de leucine et iso-leucine, ne réagissent pas à l'adjonction d'une solution complète de 18 amino-acides naturels. Nous avons pu observer des effets d'inhibition de l'activité phosphatasique par d'autres amino-acides que la leucine, mais nos expériences préliminaires n'ont permis d'obtenir aucun autre effet activateur (Tableau C (HT)). La phényl-alanine, par exemple, présente une courbe d'inhibition simple.

Enfin, certains amino-acides paraissent sans effets : parmi eux, nous avons remarqué la thréonine et l'alanine qui suivaient des relations particulières relativement indépendantes des teneurs en chlorophylles, la sérine, peut-être d'autres (tels le glycocolle, et l'asparagine) pour lesquels des mesures plus précises devront être effectuées. Compte-tenu du mécanisme à double effet démontré dans le cas de la leucine, des travaux ultérieurs pourraient être consacrés à la recherche précise des concentrations actives pour d'autres amino-acides. (Rappelons que les expériences cytocristallographiques ont permis de mettre l'accent principalement sur la leucine).

En tout dernier lieu, vient de paraître une publication de BRUNEL et CATHALA(*) confirmant l'effet inhibiteur de la leucine sur la phosphatase alcaline du cerveau de boeuf. Ces auteurs ont également obtenu une inhibition avec l'iso-leucine, la valine, la lysine, l'arginine, la phényl-alanine et le tryptophane, la proline, la thréonine, l'acide glutamique, la glutamine, mais par avec le glycocolle, la sérine, l'acide aspartique ni l'asparagine, ces derniers restant sans effet. L'action plus prononcée de la leucine est attribuée par BRUNEL et CATHALA à son poids moléculaire élevé : dans le cas du végétal, la leucine intervient, cependant, de façon particulière, du fait de ses relations privilégiées avec l'appareil photosynthétique. C'est à ce niveau que se situe la principale différence entre l'enzyme animale et l'enzyme végétale.

* BRUNEL (C) et CATHALA (G), 1971. Phosphatase alcaline du cerveau de Boeuf. Rôle du magnésium sur l'action de la L. Phényl-Alanine et d'autres acides aminés. Biochim. et Biophys. Acta, 235 (1) p 106-118

D - ETUDE HISTOCHIMIQUE DU ROLE DE LA LEUCINE SUR LES PHOSPHATASES
ET ATPases

L'activité des phosphatases et ATP^{ases} alcalines a été étudiée en lumière normale et lumière atténuée en fonction des concentrations de leucine croissantes (Planche X (HT)).

1°) Phosphatases alcalines

En lumière normale, l'activité est pratiquement nulle dans le cytoplasme, abondante dans les chloroplastes, dans une zone interne et le long de la membrane. Les modifications en présence de leucine sont peu visibles.

En lumière atténuée, l'activité est plus importante et comprend une diffusion vers le cytoplasme où elle est appréciable. La leucine entraîne une augmentation d'activité, dans ce cas.

2°) ATP^{ases} alcalines

En lumière normale, l'activité est là aussi presque nulle dans le cytoplasme et assez nettement localisée dans les chloroplastes. La leucine paraît entraîner une augmentation à fortes doses.

En lumière atténuée, il se produit, comme pour les phosphatases, une diffusion d'activité vers le cytoplasme. Dans ce cas-là la leucine entraîne une nette diminution d'activité.

Au niveau cellulaire, la lumière atténuée a permis d' amplifier les variations et les observations tendraient à montrer qu'il existe un effet inverse de la leucine sur les ATPases par rapport aux phosphatases.

RESULTATS GENERAUX ET DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de nos différentes études sur la comparaison biochimique des Mutants et des plants normaux, sur la recherche des troubles et modifications particulières du métabolisme des Mutants, et enfin, l'application des connaissances acquises à l'étude de quelques troubles de la Photosynthèse, nous ont conduit à mettre en évidence l'existence de l'un des mécanismes fondamentaux concernant le fonctionnement de l'appareil photosynthétique et sa régulation.

Dans les Mutants d'Orge et d'Arabidopsis cultivés en lumières Normale et Atténuée, nous avons comparé les teneurs en Pigments chlorophylliens, Amino-acides, Sucres et quelques dérivés Phosphorylés, par rapport aux plants Témoins.

Afin de les différencier avec plus de précision, les plants Témoins et Mutés ont été placés, ensuite, dans des conditions physiologiques particulières, en vue de mettre en évidence des caractéristiques dans leur comportement et des troubles et modifications spécifiques de leur métabolisme.

Les connaissances ainsi acquises nous ont conduit à émettre, sur le fonctionnement de l'Appareil Photosynthétique, quelques hypothèses que nous avons essayé de vérifier au cours d'expériences réalisées avec des plants normaux : leurs réponses aux divers traitements nous ont permis en particulier de corriger les principaux troubles apparus chez les Mutants viables, en les remplaçant sur la voie conduisant à une Photosynthèse de type Normal.

L'étude de la mutation chez Arabidopsis et l'Orge a montré des augmentations importantes de teneurs en amino-acides libres parallèlement à la réduction des taux de pigments chlorophylliens. Le même type de phénomène existe chez les plantes normales avec une amplitude relativement plus faible lorsqu'il se produit dans des conditions naturelles (par exemple : au cours du développement) et beaucoup plus importante au cours de conditions agressives (traumatismes) (par exemple : lumière atténuée)

Une particularité dans les variations des teneurs en amino-acides est relevée chez Arabidopsis au niveau de la leucine et l'iso-leucine ; ces deux acides se comportent d'une façon inattendue : les Mutants en conditions Normales en contiennent moins que les plants sains, alors qu'en lumière Atténuée, leur augmentation chez les Mutants aussi bien que chez les Témoins est considérablement plus forte que celle des autres amino-acides.

Ces deux amino-acides doivent donc jouer un rôle particulier au cours des troubles de la Photosynthèse. Ce résultat sera étayé plus loin par d'autres faits expérimentaux.

A côté des amino-acides libres dont l'augmentation suit régulièrement les abaissements de taux de pigments chlorophylliens, il faut signaler le comportement particulier de l'Asparagine qui se différencie par une teneur rapidement et anormalement élevé chez les Mutants (ainsi que les Témoins à basse température ou sous lumière atténuée prolongée), ce qui en fait un indicateur sensible

...

des troubles de la photosynthèse lié aux pigments en relation avec les Amino-acides.

Cette corrélation négative n'est pas toujours obligatoire : en effet, l'ensemble des amino-acides peut présenter des variations inattendues au cours des modifications pigmentaires et rendre plus complexe la caractérisation des Mutants ; ainsi :

1) à basse température, le taux de chlorophylles chez les Mutants peut remonter alors que les Amino-acides continuent à s'accumuler.

2) dans les cas limites de mutations "Xantha" et "Virido-Albina" où la teneur en pigments chlorophylliens est très faible, la teneur naturelle des plantes en amino-acides atteint une valeur maximale. Dans ce cas, lorsque le passage en lumière Atténuée fait encore diminuer les taux de pigments, on n'a pas d'augmentation consécutive d'amino-acides libres, mais au contraire, une légère diminution.

Dans le cas extrême d'un Mutant totalement dépourvu de chlorophylles, les amino-acides libres restent sensibles aux variations d'éclairement, ce qui impliquerait une participation des caroténoïdes.

3) enfin, en lumière atténuée prolongée, la plante tend à récupérer en relevant la teneur des pigments chlorophylliens, tandis que les amino-acides augmentent encore un peu.

La connaissance de ces cas particuliers et limites permet donc d'améliorer la caractérisation des Mutants et leur différenciation des plants normaux.

D'autre part, dans le cas général où la variation en sens inverse chlorophylles/amino-acides est vérifiée, on observe parfois que la proportionnalité des éléments variables n'est pas toujours fidèle : certains Mutants, au regard de l'accroissement de leur concentration en amino-acides par rapport aux Témoins, "devraient" contenir moins de chlorophylles qu'ils n'en ont en réalité : ce phénomène que nous avons observé sur les Mutants Viridis, suggérerait l'idée de l'existence de formes actives et inactives de chlorophylles, évoquée par SESTAK, (1962)(208) et SHLYK et NIKOLAYEVA (1962)(212). En effet, au cours de nos expériences de lumières Normale et Atténuée, on a pu voir des élévations de teneurs en Amino-acides libres avec maintien d'une certaine teneur en chlorophylles en lumière Normale, et lorsqu'on passe en lumière Atténuée on observe, précisément au niveau du Mutant en question, une teneur en phéophytine plus élevée, comme si cette dernière provenait de la transformation de la fraction non fonctionnelle de la chlorophylle.

Les seules données des taux d'amino-acides libres et d'asparagine ainsi que des pigments chlorophylliens prises isolément ne suffisent donc pas pour caractériser les divers Mutants.

D'autres composés métaboliques, comme les cofacteurs associés de la photosynthèse peuvent améliorer la connaissance des Mutants : ainsi, dans les deux Mutants les plus déficients en pigments chlorophylliens ("Xantha" et "Virido-Albina"), le plasto-chroménol est presque absent en lumière Normale et s'élève en lumière Atténuée.

Les variations de teneurs en sucres étudiés chez les plants normaux et mutés ne sont pas des éléments de diagnostic suffisamment sensibles pour déceler les troubles caractéristiques des Mutants : chez les "Viridis", seul le rapport Glucose/Fructose est

légèrement modifié en faveur du fructose. L'abaissement de la teneur en Glucose n'est appréciable que dans les cas extrêmes de mutations (type "Xantha" et "Virido-albina").

De tout ce qui précède, il ressort donc que, seule la connaissance simultanée des différents groupes de critères métaboliques établis permet une meilleure caractérisation des divers Mutants.

-.--.-.-.-.-.-.-.-.-

Nous avons ensuite recherché des caractéristiques biochimiques plus précises à l'aide d'autres traitements expérimentaux tels que :

- le marquage des métabolites à l'aide du ^{14}C
- le reverdissement des plantes après étiolement obscur
- l'emploi d'inhibiteurs de la photosynthèse agissant soit indirectement, soit directement et de façon spécifique.

L'étude cinétique de l'incorporation d'acétate- ^{14}C chez l'Orge, a montré que les chlorophylles des Mutants "Viridis" les moins viables (V_2 et V_3) se marquent beaucoup plus lentement que celles des plants normaux et V_1 . De même, le plasto-chroménol des Mutants est peu marqué malgré son abondance, ce qui traduit une mauvaise utilisation dans ces plants. En ce qui concerne les amino-acides, l'asparagine est bien moins marquée que la glutamine alors qu'elle est beaucoup plus abondante ; cette plus grande activité métabolique de la glutamine est en accord avec les résultats de STREETER (1970)(223) donnant à penser que celle-ci constituerait la source de NH_2 pour la synthèse d'Asparagine. Enfin, l'incorporation du ^{14}C de l'acétate dans les sucres a confirmé l'existence d'une rétro-synthèse de glucose accrue chez les Mutants à partir de la voie de EMBDEN-MEYERHOF prise en sens inverse.

L'étude du reverdissement des plants d'Orge après étiolement prolongé à l'obscurité a montré une particularité commune aux deux Mutants Viridis V_2 et V_3 avec la formation d'un dérivé caroténoïde proche de la lutéine. Ce composé n'a pu être formellement identifié, à défaut d'étalons, mais il s'agirait probablement d'une forme naturelle n'existant habituellement qu'en très faible quantité et dont l'accumulation peut traduire : soit le développement d'une voie d'oxydo-réduction de compensation, soit l'inaptitude des Mutants à réaliser à nouveau la transformation réversible d'une forme à l'autre, en particulier entre lutéine, viola-xanthine, anthéroxanthine et zéaxanthine, mécanisme courant dans les plantes normales (SAPOZHNIKOV, 1969 (201), DONOHUE, NAKAYAMA et CHICHESTER, 1966 (58)).

D'autre part, les interconnexions entre viola-xanthine, anthéroxanthine et zéa-xanthine se déroulent à l'obscurité après une photo-induction à l'aide d'éclairements allant de 500 à 35 000 lux (YAMAMOTO et coll., 1967 (252)). Dans le cas des Mutants V_2 et V_3 , il semble que la trop longue période d'obscurité de l'étiolement ait fixé irréversiblement le mécanisme, soit au stade de la zéaxanthine, soit au stade de l'anthéroxanthine ; ceci pourrait être assimilé par ailleurs à un blocage de l'effet "oxygène" (signalé très actif chez l'Orge normal (253)).

D'autres particularités métaboliques sont apparues grâce à l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de certaines réactions métaboliques : une forme de carotène plus polaire, non décelable auparavant.

L'étude des plantes normales et mutées nous a permis de mettre plus précisément en évidence certaines relations particulières existant entre les pigments photosynthétiques et les amino-acides, en particulier la leucine. De plus, les expériences d'histochimie et les auto-historadiographies ont montré que celle-ci se concentre dans les chloroplastes en des sites comparables à ceux des phosphatases. Ces divers éléments nous ont amené à aborder l'une des parties les plus importantes de ce travail : l'action de la L-leucine sur le fonctionnement de l'appareil photosynthétique en relation avec l'activité phosphatasique alcaline.

Nous avons montré, en effet, que la L-leucine, ajoutée aux extraits enzymatiques in vitro, entraîne une activation à faibles doses et une inhibition à doses élevées de l'activité phosphatasique alcaline. La cinétique de réaction évoque un mécanisme de régulation allostérique.

Il convient de rapprocher ces résultats des travaux de Cox et al, 1967 (48), suivis par ceux de GHOSH et FISHMAN, 1968 (79), GRIFFIN, 1969 (94) puis FERNLEY et WALKER, 1970 qui ont confirmé le rôle inhibiteur de la phényl-alanine vis à vis de certaines phosphatases alcalines de mammifères, selon un mécanisme de type incompétitif propre aux isomères de la série L.(70).

Chez les plantes, cependant, la régulation de l'activité phosphatasique alcaline par la leucine se répercute au niveau de l'appareil photosynthétique : la leucine administrée in vivo entraîne un accroissement de l'équipement pigmentaire à faibles doses et une forte inhibition à doses élevées. L'effet de stimulation de la L-leucine à faible dose nous a permis d'induire, chez tous nos mutants "Viridis", un net reverdissement accompagné d'un rétablissement de l'activité phosphatasique. Cependant, le mécanisme de ces phénomènes est encore plus complexe, car la leucine peut intervenir de plusieurs manières différentes.

Cependant, le mécanisme de ces phénomènes est encore plus complexe, la leucine pouvant agir de plusieurs manières.

L'inhibition de la photosynthèse par la leucine à forte dose chez les plants d'Orge normaux fait apparaître le même dérivé polaire du carotène qu'après action du p.C.M.B. Le point commun de ces deux phénomènes pourrait bien se situer au niveau de la phosphatase elle-même : en effet, les travaux de GLEW, 1970 (82), ont montré que le p.C.M.B. peut réduire de 70 % l'activité phosphatasique alcaline.

Par ailleurs, la phosphatase alcaline hydrolyse le NADP et le NADPH en NAD (WELLS et HAGEMAN, 1970 (242) : or, ces cofacteurs sont liés au pouvoir réducteur de la photosynthèse et sont nécessaires, en particulier, aux processus d'oxydo-réduction des Xanthophylles (DONOHUE et coll., 1966 (58)). De plus, les phosphatases ont la possibilité d'hydrolyser certains dérivés phosphorylés donneurs d'ATP, ainsi que le Ribulose-di-Phosphate lui-même, accepteur du CO₂.

Cependant, la régulation d'activité phosphatasique n'est pas la seule voie d'action de la leucine : celle-ci s'incorpore, en effet, dans les pigments chlorophylliens, et nos expériences réalisées chez l'Orge et l'Arabidopsis avec la leucine-(u)-¹⁴C ont montré que cet amino-acide peut stimuler ou ralentir sa propre incorporation dans les pigments selon les concentrations utilisées.

Une autre voie possible est suggérée par les travaux de GOOD, 1960 (86) montrant que des amines peuvent activer la réaction de HILL, et favoriser ainsi la photosynthèse.

L'importante accumulation de leucine et d'iso-leucine libres qui suit l'atténuation de lumière chez l'Orge et surtout chez l'Arabidopsis suggérerait l'idée de la participation de ces molé...

cules à l'édification réversible d'une protéine-fonctionnelle liée à la photosynthèse.

Nous avons pensé, tout d'abord, au complexe chromo-protéique qui contient, d'après OLSON et coll., 1969 (183) : 11 % de leucine et 6,5 % d'iso-leucine, mais également 11 % de glycocolle, 10 % d'alanine, 8,5 % d'acide aspartique, 7,8 % d'acide glutamique, 7 % de phényl-alanine, de sorte que rien ne permet d'attribuer un rôle particulier à la leucine et à l'iso-leucine.

Il en est de même pour la phosphatase elle-même dont l'apoenzyme protéique contient d'après les récents travaux de GLEW et HEATH, 1971 (82) : 6 % de leucine, mais aussi 13 % d'acide aspartique, 11 % de glycocolle, 9 % d'acide glutamique, 7,5 % de thréonine. Or, l'accumulation de ces divers amino-acides en lumière atténuée est très inférieure à celle des leucines. De plus, le site actif de la phosphatase contiendrait plus particulièrement de la phosphosérine, d'après ENGSTROM, 1962 (61). Ces divers éléments ne permettent pas d'expliquer les variations de concentration en leucines par les fluctuations de synthèse des phosphatases.

Par contre, les travaux de MARGULIES, 1970 (161) ont montré que la leucine- ^{14}C s'incorpore très bien dans la ribulose-di-Phosphate carboxylase qui suit, par sa quantité présente, les variations d'éclairement des plantes : la Ru.di.P Carboxylase baisse d'activité quand la lumière et les chlorophylles diminuent (KLEIN-KOPF, 1970 (133)) et augmente avec l'intensité lumineuse, selon BOWES et OGREN, 1970 (27).

Ces derniers ont remarqué, de plus, que la baisse d'activité en lumière atténuée n'est pas suivie tout de suite d'une baisse de synthèse de la protéine elle-même. Les observations de ces auteurs associées à nos propres résultats peuvent suggérer la participation de la leucine et de l'iso-leucine à l'édification réversible du site actif de la molécule, avec "désactivation" secondaire libérant en premier lieu ces deux amino-acides en lumière atténuée. Cette hypothèse paraît se confirmer avec les travaux de AKOYUNOGLU et coll., 1969 (1), qui ont stabilisé le complexe Ru.di.P. Carboxylase - $^{14}\text{CO}_2$ avec le diazométhane et l'on en a ensuite découpé en petits fragments dont le plus riche en $^{14}\text{CO}_2$ est un petit peptide formé de trois types d'acides aminés différents, dont la leucine et l'iso-leucine précisément. Ces amino-acides sont effectivement capables de fixer le CO_2 in vitro sous forme de carbamate (1) ; leur position dans la molécule leur conférerait alors un rôle privilégié d'accepteur de CO_2 . Les variations de concentration à l'état libre en fonction de l'éclairement, pourraient donc bien refléter le mécanisme de l'édification réversible du site actif de la ribulose-di-Phosphate Carboxylase.

L'influence de la leucine sur la photosynthèse doit s'exercer également par l'intermédiaire de l'ATP^{ase} : en effet, la L. leucine agit sur l'activité ATP^{asique} de façon opposée à celle des phosphatases, et l'ATP est impliquée dans la phosphorylation et le transfert de protons à travers la membrane des chloroplastes (MITCHELL, 1966 (169)). De plus, les expériences histochimiques ont montré qu'en lumière atténuée l'ATP^{ase} baisse d'activité et que la leucine administrée à dose activatrice pour la phosphatase, tend à inhiber davantage l'activité ATP^{asique}. L'ATP initialement formé à la lumière, peut être de la sorte préservé par l'abaissement d'activité de l'ATP^{ase} en lumière atténuée, d'autant plus que, dans ces conditions, la concentration en leucine a nettement augmenté du fait de la désactivation du site actif de la Ru.di.P.Carboxylase.

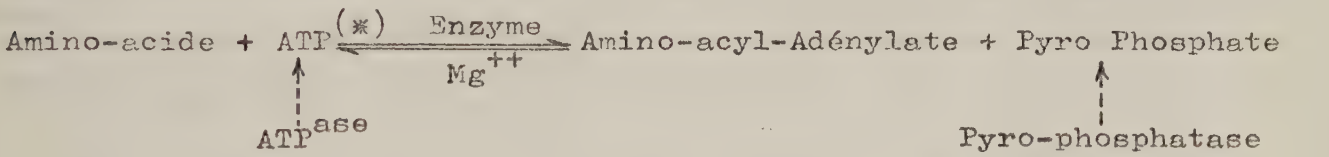
L'action de la leucine sur la régulation des teneurs en ATP fait entrevoir une autre voie reliant la Photosynthèse et les acides et protéines, par le biais des ARN.

Divers auteurs ont établi des relations entre la synthèse protéique (essentiellement au niveau des ARN) et la photosynthèse : ainsi, le chloramphénicol (176), la streptomycine (204), le chlorure de chloro-éthyl-2-triméthyl-ammonium (17) inhibent la synthèse des protéines et en même temps l'appareil photosynthétique ou la formation des pigments. Signalons, par ailleurs, que MOOG, 1966 (170) a montré, chez la souris, que l'actinomycine D et la puromycine stimulent l'activité phosphatasique qui se trouve donc à nouveau impliquée ici.

Les résultats de nos propres expériences, après action de l'aza-guanine sur les ARN ont fait apparaître des perturbations de la photosynthèse avec accumulation anormale d'un dérivé polaire du carotène, ce qui est à rapprocher de l'effet du p.C.M.B. sur la photophosphorylation. De même, la di-coumarol provoque, également, une réduction des taux de pigments chlorophylliens et caroténoïdiens : or, d'après CARMELL et AVRON, 1969 (40), certains agents découplants agissent sur l'ATP^{ase} chloroplastique, soit comme stimulants, soit comme inhibiteurs. D'autre part, selon KNIPL et KULAEVA, 1970 (134), l'incorporation de la leucine- ¹⁴C dans les ARN de l'Orge est inhibée par les coumarines.

Dans ces conditions, sachant que le glyocolle participe à la biosynthèse des ARN, il n'est pas surprenant que nos expériences d'inhibition de son élaboration à partir de la sérine aient conduit, non seulement à une réduction notable de la synthèse chlorophyllienne (nécessitant du glyocolle comme précurseur), mais encore, à l'apparition du même dérivé polaire du carotène qu'au cours des expériences précédentes avec l'Aza-guanine.

En définitive, le point commun entre la leucine, l'ATP^{ase} et l'ARN doit, vraisemblablement, se situer au niveau de la phase d'activation des amino-acides en vue de leur fixation sur l'ARNt selon la réaction :



(*) Selon les amino-acides, d'autres nucléotides que l'ATP pourraient intervenir, par exemple ITP, UTP avec la leucine

Rappelons que les complexes activés ARNt - Amino-acides vont ensuite se disposer le long des chaînes d'ARNm pour constituer les protéines, au contact des ribosomes. L'incidence de troubles à ce niveau peut se répercuter, entre autres, sur des enzymes de la photosynthèse, voire même sur les complexes pigmentaires chromoprotéiques : cependant, il est nécessaire, pour admettre un effet préférentiel vis à vis du domaine photosynthétique, d'envisager l'existence d'une spécificité des protéines concernées (chloroplastiques) vis à vis des autres.

De récents travaux viennent, effectivement, accréditer cette hypothèse : WILLIAMS et WILLIAMS, 1970 (248) ont montré que le leucyl-ARNt peut s'hybrider avec l'ADN, mais de préférence l'ADN chloroplastique plutôt que cytoplasmique ; ANDERSON et ADVANI, 1970 (3) et ANDERSON, 1970 (4) ont montré que les mêmes enzymes (Trioses-Phosphates-isomérases, phospho-3-glycérate-kinase, Fructose 1-6-di-Phosphate-aldolase), isolées respectivement des chloroplastes et du cytoplasme, sont, en fait, des protéines distinctes : il existe donc des différences de propriétés entre les protéines chloroplastiques et leurs homologues cytoplasmiques ; d'ailleurs, MATSUDA et coll., 1970 (163), en étudiant les relations ARN-ADN, ont observé des différences entre les ARNm respectifs des chloro-...

plastés et du cytoplasme.

Chaque organisation cellulaire paraît donc posséder une individualité propre et les moyens d'exercer en elle-même une régulation élective et indépendante.

Au cours d'expériences d'irradiations cellulaires à l'aide de pinces étroites de rayons ultra-violet, une exploration des résultats d'action au niveau du noyau et du cytoplasme de l'Euglène a permis à plusieurs auteurs dont GIBOR, 1962 (80) d'observer l'apparition de mutations chlorophylliennes seulement après irradiation de régions cytoplasmiques où se trouvent les plastés et proplastés chloroplastiques : l'ADN nucléaire n'est pas impliqué dans le phénomène et l'on peut penser que l'ADN-chloroplastique pourrait conditionner les ARN pour conférer au chloroplaste sa spécificité vis-à-vis du cytoplasme.

Le rôle de la leucine dans l'activation et la régulation des phosphatases et ATP^{ase} est à mettre en relation avec sa participation aux mécanismes de transfert des molécules à travers les membranes (169), ce que confirment les expériences d'enzymologie et d'histochemie.

Ces résultats doivent être rapprochés des effets insuliniques de la leucine observés chez l'animal, et peut-être, inversement, de l'effet de l'insuline sur l'incorporation de leucine-¹⁴C dans certaines protéines végétales (84).

Nous avons développé plus particulièrement, au cours de nos recherches, les études concernant la leucine, principalement du fait des résultats d'analyse des Mutants (*Arabidopsis*) et des observations cytochimiques parallèles ; cependant, il est permis de penser que d'autres amino-acides peuvent contribuer à l'ensemble du mécanisme, soit par leurs relations réciproques par induction et répression enzymatique (-contrôle réciproque de valine-leucine et iso-leucine, (74), induction de leucine-décarboxylase par l'alanine (100), -), soit à cause de leur interdépendance avec d'autres familles biochimiques liées à la photosynthèse, telles que les glucides (8)(181)(202).

Enfin, nous n'avons pas rapporté dans ce travail certains résultats concernant des modifications de synthèse des noyaux de types flavonoïdes, d'une part sous l'effet des mutations (diminution chez les Mutants *viridis*) et d'autre part sous l'action des inhibiteurs (accumulation chez les plants normaux traités par l'azaguanine ou la L-leucine à dose toxique). Cette question mériterait cependant, d'être approfondie, car, les flavonoïdes ont déjà été décrite par STENLID, 1970 (222) comme les inhibiteurs mitochondriaux de la formation d'ATP.

CONCLUSION

La mise au point d'un ensemble de microméthodes quantitatives précises nous a permis d'aborder l'étude simultanée de nombreux facteurs du métabolisme au niveau des plantes supérieures normales et mutées ; L'analyse des modifications biochimiques apparues dans diverses conditions expérimentales nous a permis de tirer les conclusions suivantes.

Les mutants sont caractérisés essentiellement par une réduction des teneurs en pigments photosynthétiques (et un ralentissement de leur métabolisme) associée à une augmentation de concentration en amino-acides libres et en particulier l'Asparagine. Nous avons pu montrer, chez les plants normaux comme chez les mutants, que la plupart des amino-acides libres suivent, en fait, des variations de sens opposé à celles des pigments chlorophylliens et caroténoïdes et plus précisément :

- que l'asparagine est un produit d'accumulation caractéristique des mutants
- que la leucine et l'iso-leucine sont particulièrement sensibles aux traitements lumineux et aux modifications de l'appareil photosynthétique en général. De plus, les variations de teneur en leucine présentent d'étroites relations avec celles des caroténoïdes, et la leucine- ^{14}C s'incorpore dans tous les pigments photosynthétiques. D'autre part, au niveau cellulaire, la leucine est très concentrée dans certains granules chloroplastiques pouvant coïncider avec des sites d'activité phosphatasique.
- Les sucres ne sont affectés de façon considérable que dans les cas de troubles très prononcés atteignant la glycolyse (avec accumulation de saccharose)
- Enfin, sur le plan qualitatif, seule l'étude du reverdissement après étiolement prolongé a permis de faire accumuler, chez les deux mutants d'Orge les moins viables, un dérivé caroténoïde nouveau qui n'apparaît jamais dans les autres cas.

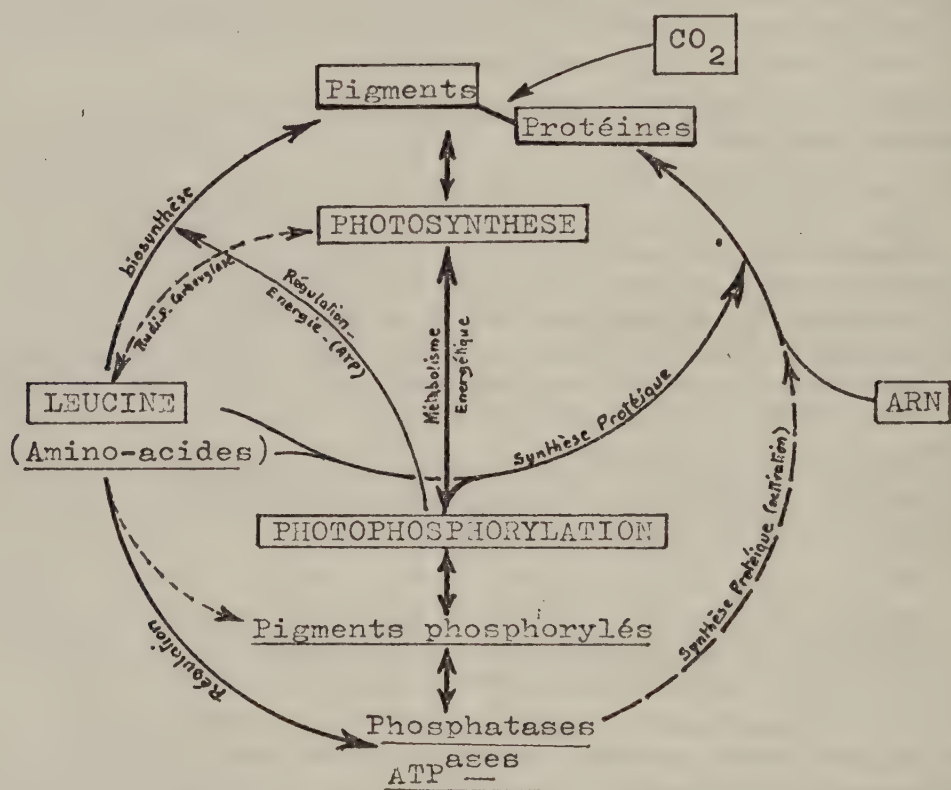
Si la mise en évidence de caractéristiques spécifiques des mutations s'est avérée longue et délicate, l'étude approfondie des plantes normales et mutées nous a cependant permis de découvrir un mécanisme important concernant l'action régulatrice de la leucine sur l'appareil photosynthétique. Les différents niveaux d'intervention de cet effecteur semblent pouvoir être résumés ainsi :

- a) La leucine stimule ou inhibe le fonctionnement de l'appareil photosynthétique, selon sa concentration dans les chloroplastes, en modifiant les teneurs pigmentaires et en participant au fonctionnement de la Ribulose-di-phosphate-carboxylase, comme site de fixation de CO_2 . Cette propriété nous a permis d'induire un verdissement accru chez tous nos mutants "Viridis".
- b) La leucine agit sur la photophosphorylation en exerçant un effet de régulation directe de l'activité phosphatasique alcaline dans les chloroplastes : elle provoque, en effet, comme pour l'équipement pigmentaire, une activation à faible dose et une inhibition à dose élevée. Cette action, qui dépend de l'éclairement, se manifeste également vis à vis des ATPases mais dans un sens opposé - notamment en lumière atténuée - ce qui doit permettre, en particulier, de protéger, à l'obscurité, l'ATP formé à la lumière.

...

- c) Inversement, les modifications de la photosynthèse se traduisent au niveau de la concentration en leucine libre et provoquent une action en retour sur les phosphatases et la phosphorylation. Un exemple typique nous en a été offert par le mutant d'Arabidopsis de type "Viridis" dans lequel une altération de la chaîne de phosphorylation oxydative se traduit par une augmentation d'activité phosphatasique et une teneur réduite en leucines. Les modifications de la photophosphorylation observées chez certains mutants d'Orge tendraient à impliquer d'autre part, la participation de formes particulières dérivées du β carotène.

Enfin, sachant que la photosynthèse est conditionnée sur le plan énergétique par la phosphorylation, avec formation d'ATP, et réciproquement, les diverses voies du mécanisme pourraient être schématisées ainsi, compte-tenu de nos résultats et des données bibliographiques :



L'étude développée pour la leucine ne constitue qu'un premier pas, car d'autres amino-acides pourraient intervenir à divers titres, soit pour s'associer, soit pour compléter ou pour remplacer la leucine dans diverses conditions physiologiques et en fonction des espèces végétales.

"La Physique des végétaux, qui conduit à la perfection de l'agriculture, est une de ces sciences dont le progrès ne s'augmente que par une multitude d'Observations qui ne peuvent être l'ouvrage ni d'un homme seul ni d'un temps borné".

DUHAMEL ET DE BUFFON

Mémoires pour l'Académie des
Sciences pour l'année 1737

BUFFON - Oeuvres complètes -
tome 12 p. 121



BIBLIOGRAPHIE

- 1 AKOYUNOGLU (G) et ARGYROUDI-AKOYUNOGLU (J.H.), 1969. Mechanism of the first carboxylation reaction in Photosynthesis. Progress in Photosynthesis Research, Vol. III, p 1519-1528
- 2 AKOYUNOGLU (G), ARGYROUDI-AKOYUNOGLU (J.M.), GUIALI(A) et DASSIOU (C), 1970. On the relationship between Ribulose Diphosphate Carboxylase and Protochlorophyllide Holo-chrome of Phaseolus vulgaris Leaves. Plant. Physiol. 45(4) p 443-446
- 3 ANDERSON (L.E.) et ADVANI (V.R.), 1970. Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes : Three Distinct Isoenzyme Associated With The Reductive Pentose Phosphate Cycle. Plant Physiol. 45 (5) p 583-585
- 4 ANDERSON (LE), 1970. Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes. II Pea leaf Triose Phosphate Isomerases. Biochim. et Biophys. Acta, 235, p 237-244
- 5 ABDUL-BAKI(A.A.), 1970. Metabolism of Barley seed During Early Hours of Germination. Plant Physiol. 44(5) p 733-738
- 6 ATKIN (R.K.) et SAMIA-SRIVASTA (B.I.), 1968. Changes in Nucleic Acid Metabolism of Excised Barley Leaves During Senescence and the effects of Kinetin on these Changes. Physiol. Plant. 21 p 1234-1240
- 7 AVRON (M.), 1962. A Coupling Factor in Photophosphorylation. Coll. Intern. CNRS. La Photosynthèse, p 35
- 8a BACQUES (C) et RUCKEBUSCH (Y), 1965. Tyrosine et Métabolisme Glucidique Chez le Chien. C. R. Soc. Biol. 159 (2) p 409-412
- 8b BACQUES (C) et RUCKEBUSCH (Y), 1965. Activité Hyperglycémiant de la Lysine Chez le Chien. C. R. Soc. Biol. 159 (4) p 873-875
- 9 BACON (M.F.), 1967. Changes in Chlorophylls Resulting From Various Chemical And Physical Treatments of Leaf Extracts. Phytochem. 6 p 193-210
- 10 BAILEY (J.L.) et KREUTZ (W), 1969. Characterisation of Pigment Protein Complexes Related to Photosystems I et II. Progress in Photosynthesis Research, Vol. I p 149-158
- 11 BARNARD (R.A.) et OAKS(A), 1970. Metabolism of Proline in Maize Root Tips. Can. J. Bot., 48 (6) p 1155-1158
- 12 BARR (R), HUANG (K) et CRANE (F.L.), 1965. Plastoquinone Distribution in Various plant Series. Plant Physiol. 40 suppl. p XXII
- 13 BEEVERS (L), BROWN, LANG, MACHLIS, SKOOG et SIEGELMAN (R.H.), 1962. Ann. Rev. Plant. Physiol. 13 502p
- 14 BEEVERS (L) et HAGEMAN (R.H.), 1969. Nitrate Reduction in Higher Plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 20 p 495-522
- 15 BERG (P), BERGMANN (F.H.), OFFENGAND (E.J.) et DIECKMANN (M), 1961. The Enzymic Synthesis of Amino Acyl Derivatives of Ribonucleic Acid. I-the Mechanism of Leucyl-Valyl-Isoleucyl and Methionyl Ribonucleic Acid Formation. J. Biol. Chem. 236 (4-6) p 1726-1734

- 16 BERGMANN (F.H.), BERG (P) et DIEKMANN (M), 1961. The Enzymic Synthesis of Amino Acyl Derivatives of Ribonucleic II - The preparation of Leucyl-Valyl-Isoleucyl and Methionyl Ribonucleic Acid Synthetase From Escherichia Coli. J. Biol. Chem. 236 (6) p 1735-1740
- 17 BERRY (D.R.) et SMITH (H), 1970. The inhibition by High Concentrations of (2-Chloroethyl)-Trimethyl Ammonium Chloride of Chlorophyll and Protein Synthesis in Excised Barley Leaf Sections. Planta (Berl.) 91 (1) p 80-86
- 18 BERRY (J.A.), DOWNTON (W.J.S.) et TREGUNA (E.B.), 1970. The Photosynthetic Carbon Metabolism of Zea Mays and Gomphrena globosa : The Location of the CO₂ Fixation and the Carboxyl-Transfer Reactions. Can. J. Bot., 48 (4) p 777
- 19 BICK (M.D.) et STREHLER (B.L.), 1971. Leucyl-Transfer-RNA. Synthesis Changes During Soybean Cotyledon Senescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68 (1) p 224-228
- 20 BIRD (F.), PORTER (H.K.) et STOCKING (C.R.), 1964. Intra cellular Localisation of Enzymes Associated With Sucrose Synthesis in Leaves. Biochim. Biophys. Acta. 100 (2) p 366-375
- 21 BOARDMAN (NK) et HIGHKIN (HR), 1966. Studies on a Barley Mutant lacking chlorophyll (b). I Photochemical activity of isolated chloroplasts. Biochim. et Biophys. Acta, 126, p 189-199
- 22 BOGORAD (L), 1962. Chlorophylls. Physiol. Bioch. Algae, p 385-408
- 23 BOURQUE (Don P.) et NAYLOR (A.W.), 1971. Large Effects of Small Water Deficits on Chlorophyll Accumulation and Ribonucleic Acid Synthesis in Etiolated Leaves of Jack Bean (Canavalia ensiformis (L.) DC). Plant. Physiol. 47 p 591-594
- 24 BOUNIAS (M), 1969. Une Microméthode d'Analyse Quantitative par Chromatographie en Couche Mince des Sucres, Amino-acides, Pigments et Co-facteurs Ethérosolubles de Plantes d'Arabidopsis thaliana (L) Heynh. Chimie Analytique p 76-82
- 25 BOUNIAS (M), 1967. Etude du Développement d'Arabidopsis thaliana après Irradiation des Graines Sèches. D. E. A. Faculté des Sc. LYON. 12 p.
- 26 BOVARNICK (J.G.), 1970. Cellular Origins of Chloroplast Enzymes in Euglena. Ann. Meet. Am. Soc. Plant. Physiol., Aug. 23-27 1970, Abstract Plant Physiol. Suppl. 46 p 7
- 27 BOWES (G) et OGREN (W.L.), 1970. The Effect of Light Intensity and Atmosphere on Ribulose di-Phosphate Carboxylase Activity. Plant Physiol. Suppl. 46 p 7
- 28 BOYNTON (J.E.), 1967. Chlorophyll Deficient Mutants in Tomato Requiring Vitamin B₁. I - Genetics and Physiology - Hereditas 56 (2-3) p 172-199
- 29 BOYNTON (JE), 1967. Chlorophyll Deficient Mutants in Tomato Requiring Vitamin B₁. II - Abnormalities in Chloroplast Ultrastructure. Hereditas 56 (2-3) p 238-254
- 30 BRADFIELD (J.R.G.), 1950. The Localisation of Enzymes in Cells. Biol. Rev. 25 p 113-157

- 31 BRETON (B), BONNOT (G), NARDON (P) et LAVIOLETTE (P), 1967. Les Phosphatases Alcalines du Testicule de *Lebistes Reticulatus* : Mise au point d'une Microméthode de Détermination Quantitative. C. R. Acad. Sci. Paris 265 p 161-164
- 32 BREYHAN (T), HEILINGER (F) et FICHNICM (O), 1959. Über das Vorkommen Und Die Bedeutung des Prolins in der Kartoffel. Landw. Forsch. 12 (4) p 293
- 33 BRIANTAIS (J.M.), 1968. Isolement de Structures Liées aux Deux Systèmes Photochimiques des Chloroplastes. Bull. Soc. Franc. Physiol. Végét. 14 (2) p 227-244
- 34 BROCK (D.R.), 1967. Quantitative Variation in *Arabidopsis thaliana* Induced by Ionizing Radiations. Rad. Bot. USA 7(3) p 193-203
- 35 BRODY (S.S.), 1970. Low Temperature Reactions in Chloroplasts. Z. Naturforsch. 25 p 860-862
- 36 BROWN (J.A.M.), 1964. A Temperature Sensitive Late Flowering Mutant of *Arabidopsis* - Genetics 50 p 237-238
- 37 BROWN (J.S.), 1962. Forms of Chlorophyll A and Photosynthesis. Coll. Intern. CNRS. La Photosynthèse p 371
- 38 BUISSIÈRE (J), FOURCARD (A) et COLOBERT (L), 1967. Usage de Substrats Synthétiques pour l'Etude de l'Équipement Enzymatique de Micro-organismes. C. R. Acad. Sc. Paris p 415-417
- 39 BULLEY (N.R.), 1970. Photosynthesis and Photorespiration Rates at the CO₂ Compensation Point. Can. J. Bot. 48 (6) p 1271-1276
- 40 CARMELI (C) et AVRON (M), 1969. Uncouplers as Stimulator and Inhibitors of ATP^{ase} Activity in Chloroplasts. Progress in Photosynthesis Research - Vol. III, p 1169-1175
- 41 CHAMPIGNY (M.L.) et BISMUTH (E), 1970. Effet de l'ATP et de Mg⁺⁺ sur les activités Ribulose-di-Phosphate-Carboxylase et Ribose 5-Phosphate Isomérase et Kinase d'une Préparation Enzymatique de Chloroplastes. Can. J. Bot. 48 (6) p 1227-1233
- 42 CHANCE (B), KIHARA (T), DEVAULT (D), HILDRETH (W), NISHIMURA (M) et HIVAMA (T), 1969. Temperature Insensitive Electron Transfer in Photosynthetic Systems. Progress in Photosynthetic Research, Vol. III p 1321-1346
- 43 CHELLET (R) et PAOLILLE (D.J.), 1970. Pigment Concentration, Plastid Structure and Photosynthetic Capacity of a Virescent Corn Mutant. Abstr. Plant Physiol. 46 suppl. p 22
- 44 CHIA-YIN TSAI et NELSON (O.E.), 1966. Starch Deficient Maïze Mutant Lacking ADP-Glucose Phosphorylase Activity - Science (USA) 151 (3708) p 341-343
- 45 CLAES (Von H), 1958. Biosynthese Von Carotinoiden bei *Chlorella* IV - Die Carotinsynthese Einer *Chlorella* Mutante Bei Anaerober Belichtung. Z. Natur. Forsch. 13 p 222-224
- 46 CLAES (Von H), 1959. Biosynthese Von Carotinoiden Bei *Chlorella* V - Die Trennung Von Licht Un Dunkelreaction Bei Der Lichtabhängigen Xanthophyll Synthese Von *Chlorella*. Z. Natur. Forsch. 14 p 4-7

- 47 COSSINS (E.A.) et CABALLERO (A), 1970. Further Studies of Intermediary Metabolism in Radish Cotyledons: The Utilization of Glycine, Glyoxylate and Acetate by Tissue Disk. Can. J. Bot 48 (10) p 1767-1774
- 48 COX (R.P.), GILBERT (P) et GRIFFIN (M.J.), 1967. Alkaline Inorganic Pyro-phosphatase Activity of Mammalian Cell Alkaline Phosphatase. Biochem. J. 105 p 155-161
- 49 CROSSET (R.N.), 1968. Effect of Light on the Translocation of Phosphorus by Seedlings of Hordeum vulgare (L.) - Austr. J. Biol. Sc. 21 p 225-233
- 50 CYBIS (J) et WEGLENSKI (P), 1969. Effects of Lysine on Arginine Uptake and Metabolism in Aspergillus Nidulans. Molecular Gen. Genetics. 104 p 282-287
- 51 CURL (A.L.), 1965. J. Food Science 30 p 426
- 52 DANIELLI (J.F.), 1954. Phosphatases and other Enzymes Considered in Relation to Active Transport and the Functions of Fibrous Protein Structures.
- 53 DASSIOU (C) et AKOYUNOGLU (G), 1969. Effect of Light on the Ru-di-P carboxylase Activity in Etiolated Plants of Different Ages. Progr. in Photosynth. Res. Vol III p 1631-1635
- 54 DEMEREC (M.), 1935. Behaviour of Chlorophyll Inheritance - Cold Spr. Harb. Symp. 3 p 80-86
- 55 DIXON (M), 1954. The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. Biochem. J. 55, p 170-171
- 56 DIXON (M) et WEBB (E.C.), 1964. Enzymes - Ed. Longmans, Green and Co., London.
- 57 DOLPHIN (W.D.), 1970. Photo Induced Carotenogenesis in Chlorella Euglena gracilis. Plant. Physiol. 46 (5) p 685-69
- 58 DONOHUE (H.V.), NAKAYAMA (T.O.M.) et CHICHESTER (C.O.), 1966. Oxygen Reactions of Xanthophylls, Biochemistry of Chloroplasts, Vol. 2
- 59 DOWNTON (W.J.S.), 1970. Preferential C_4 -dicarboxylic Acid Synthesis, the Post Illumination CO_2 Burst, Carboxyl Transport Step and Grana Configuration in Plants with C_4 -Photosynthesis. Can. J. Bot. 48 p 1795-1800
- 60a DURANTON (J), 1966. Biosynthesis of Chlorophyll b during the greening phase of etiolated plantlets of Zea mays. Physiol. Veg. 4 (1) p 75-88
- 60b DURANTON (H) et SCHANTZ (R), 1964. Incorporation of Carbon at the end of proline in the Chlorophyll molecule of Chlorella pyrenoidosa. C.R. Acad. Sc. t. 259 (22) p. 4114-41
- 61a ENGSTROM (L), 1962. Studies on Calf-intestinal Alkaline Phosphatase. I - Chromatographic Purification, Microheterogeneity and Other Properties of the Purified Enzyme. Biochim. Biophys. Acta 52 p 36-48
- 61b ENGSTROM (L), 1962. Studies on Calf-intestinal Alkaline Phosphatase. II - Incorporation of Inorganic Phosphate into Highly Purified Enzyme Preparation. Biochim. Biophys. Acta. 52 p 49-59
- 62 ERIKSSON (G), KAHN (A), WALLIS et VON WETTSTEIN (D), 1961. Makro-molecular Physiologie Der Chloroplasten - III Ber. Deut. Ges. 74 p 221

- 63 EULER (H. V.) et BERGMAN (B), 1933. Chromatophoren Degeneration In Laubblättern Von Chlorophyll Defekten Gersten-Mutanten Deut. Bot. Gesell. 51 p 283-290
- 64 EULER (MV), BERGMAN (B), HELLSTROM et BURSTROM, 1935. Konstanz Des Chlorophyll Gehaltes Und Chromatophoren Degeneration Chlorophyll-Mutierender Gersten Sippen
- 65 EYSTER (WH), 1924. Inherited Deficiency in Carbohydrate Metabolism in Maïze. Bot. Gaz. 78 p 446-452
- 66 EYSTER (HC), 1950. Catalase Activity In Chloroplast Pigment. Deficient Types Of Corn. Plant Physiol. 25 p 630-638
- 67 FALUDI-DANIEL (A), 1962. The Role Of Leucine In The Biosynthesis Of Leaf Pigments In Higher Plants. Coll. Intern. CNRS. La Photosynthèse n° 119. p 638-644
- 68 FALUDI-DANIEL (A), NAGY (AH) et NAGY (A), 1969. Chlorophyll Synthesis In Normal And Photosensitive Maïze Leaves. Progress in Photosynthesis, Vol. II p 592-598
- 69a FEENSTRA (WJ), 1966. Isolation Of Nutritional Mutants In Arabidopsis thaliana. Genetica 35 p 259-269
- 69b FEENSTRA (WJ), 1965. Biochemical Genetics Of Thiamine-biosynthesis Arabidopsis Information Service, suppl. 1 p 113-118 et Genetica 245
- 70 FERNLEY (HN) et WALKER (PG), 1970. Inhibition of Alkaline Phosphatase by L-Phenyl-Alanine. Biochem. J., 116, p 543-544
- 71 FIASSEON (JL), ARPIN (N) et LEBRETON (P), 1969. Sur l'Analyse Qualitative et Quantitative des Caroténoïdes Naturels. Chimie Analytique 51 (5) p 227-236
- 72 FISHMAN (WH) et GHOSH (NK), 1967. Influence of reagents reacting with metal, thiol and amino sites of catalytic activity and L-phenyl-alanine inhibition of rat intestinal alkaline phosphatase. Biochem. J. 105 p 1163-1170
- 73 FORK (DC), 1969. Evidence For The Participation Of Carotenoids In The Photosynthesis of Algae And In a Higher Plant. Progress in Photosynthesis Research, vol. II p 800-810
- 74 FREUNDLICH (M), BURNS (RO) et UMBARGER (ME), 1962. Control Of Isoleucine, Valine And Leucine Biosynthesis. I - Multivalent Repression. Proc. Natl. Acad. Sc. 48 (9) p 1804-1808
- 75 FUJII (T) et ONO (Y), 1961. Relations Between Chlorophyll Content And Free Amino-acids In Einkor Wheat Mutants. Proc. Jap. Acad. 37 p 633-637
- 76 GAMBORG (OL), 1970. The Effect Of Amino-acids And Ammonium On The Growth Of Plant Cells In Suspension Cultures. Plant. Physiol. 45 p 372-375
- 77 GAREN (A) et ECHOLS (H), 1962. Genetic Control Of Induction Of Alkaline Phosphatase Synthesis In E-Coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (5) p 1398-1402
- 78 GARNIER (J), 1965. Utilisation de Mutants dans l'Etude de la Photosynthèse. Rev. Physiol. Vég. 3 p 121-154
- 79 GHOSH (NK), et FISHMAN (WH), 1968. L-Phenyl-Alanine inhibition of Rat Intestinal Alkaline Phosphatase : A Homosteric Phenomenon. Arch. of Biochem. and Biophys., 126, p 700-706

- 80 GIBOR (A) et GRANICK (S), 1962. Ultraviolet-sensitive Factor The Cytoplasm That Affect The Differentiation Of Eug Plastids. J. Cell. Biol. USA 15 (3) p 599-603
- 81 GICHNER (T), 1966. Relation of Some M₁ Characters to the Fre of M₂ Mutants in Arabidopsis thaliana. Biol. Plant. 8 p²209-212
- 82 GLEW (RH) et HEATH (EC), 1971. Studies on the Extracellular Alkaline Phosphatase of Micrococcus Sodonensis. I - tion and Characterization. J. Biol. Chem. 246 (6) p 1556-1565
- 83 GLEW (RH) et HEATH (EC), 1971. Studies on the Extracellular Alkaline Phosphatase of Micrococcus Sodonensis. II - tors Affecting Secretion. J. Biol. Chem. 246 (6) p 1566-1574
- 84 GOLDSTEIN (S) et REDDY (WJ), 1967. Effect of Insulin on the Incorporation of ¹⁴C-leucine into Rat Caudofeinoale Protein. Biochim. Biophys. Acta 141 p 310-318
- 85 GOOD (NE) et coll., 1966. Hydrogen Ion Buffers For Biological Research. Biochemistry 5 p 467-477
- 86 GOOD (NE), 1960. Activation of the Hill Reaction by Amines. Bioch. Bioph. Acta 40 p 502-517
- 87 GOODWIN (TW), 1969. Carotenoid Biosynthesis in Chloroplasts. Progress In Photosynthesis Research Vol. II p 669-
- 88 GOSTIMSKII (SA), 1966. A Photosynthetic Pisum sativum Mutant Genetika (Soviet Genetics) 2(4) p 80-85
- 89a GOTTSCHALK et MULLER, 1964. Quantitative Pigmentuntersuchung an Strahlenin Auzierten Chlorophyllmutanten Von Pisum sativum. I - Planta 61 p 259-282
- 89b GOTTSCHALK et MULLER, 1964. Quantitative Pigmentuntersuchung An Strahlenin Auzierten Chlorophyllmutanten Von Pisum sativum. II - Planta 62 p 1-21
- 90a GRANICK (S), 1951. Biosynthesis Of Chlorophyll And Related P Ann. Rev. Plant. Physiol. 2 p 115-144
- 90b GRANICK (S), 1960. Mg-protoporphyrin Monoester And Protoporp Monomethyl-ester In Chlorophyll Biosynthesis. J. Bio Chem. 236 (4) p 1168-1172
- 91 GRANDSIRE (A), 1926. Le Chimisme des feuilles privées de Chlo phylle..Ann. Sc. Nat. Bot. 10ème série 8 (16) p 22 290
- 92 GRAY (IK), RUMSBY (MG) et HAWKE (JC), 1967. The Variations I Linolenic Acid And Galactolipid Levels In Gramineae Species With Age Of Tissue And Light Environment. Phytochemistry 6 p 107-113
- 93 GREGORY (FG) et HUSSEY (GG), 1953. Photoperiodic Responses O Arabidopsis thaliana. Proc. Linn. Soc. Lond. 164 p 137-139
- 94 GRIFFIN (MJ), 1969. Separation and Characterization of Hela Alkaline Pyrophosphatase Isoenzymes. Arch. of Bioche and Biophys., 132, p 299-307
- 95 GRIFFING (B) et LANGRIDGE (J), 1962. Phenotypic Stability Of Growth In The Self Fertilized Species : Arabidopsis thaliana. "Statistical Genetics and Plant Breeding". Natl. Acad. Sci. Natl. Res. Council, Publ. N° 982 p 368-394

- 96 GRUBE (KH), 1953. The Phosphate Content As Related To Photosynthesis In Helodea Densa. Planta 42 p 279-303
- 97 GUSTAFSSON (A), 1940. The Mutation System Of Chlorophyll Apparatus. Lunds. Univ. Arssk. 36 p 1-40
- 98 HALLIER (UW), 1966. On The Use Of ^{14}C and ^{32}P In Locating Genetically Caused Defects In Photosynthesis Of Some Plastide Mutants. Symp. FAO/AIEA. Use Of Isotopes In Plant Nutrition And Physiology. Vienne - 5-9 sept 66 p 235-245
- 99a. HATCH (MD), SLACK (CR) et BULL (TA), 1969. Light Induced Changes In The Content Of Some Enzymes Of The C_4 -dicarboxylic Acid Pathway Of Photosynthesis And Its Effects On Other Characteristics Of Photosynthesis. Phytochemistry 8 p 697-706
- 99b HATCH (MD) et SLACK (CR), 1970. The C_4 -dicarboxylic Acid Pathway of Photosynthesis. Progress in Phytochemistry. Vol. 2 p 35-106
- 99c HATCH (MD) et SLACK (CR), 1968. A New Enzyme for the Interconversion of Pyruvate and Phosphopyruvate and its Role in the C_4 Dicarboxylic Acid Pathway of Photosynthesis. Biochem. J. 106 p 141-146
- 100 HAUGHTON (BG) et KING (HK), 1961. Induced Formation of Leucine Decarboxylase in Proteus vulgaris. Biochem. J., 80, p 268-277
- 101 HEBER (U), 1962. On the Nature of the Genetic Block of Photosynthesis in a Mutant of Vicia Faba. Coll. Intern. CNRS La Photosynthèse
- 102 HELLER (R), 1953. Recherches sur la Nutrition Minérale des Tissus Végétaux Cultivés in Vitro. Ann. Sc. Nat. 14 p 2
- 103 HEYTING (J) et FEENSTRA (WJ), 1966. Reverse Mutation of Py Mutants. Arabidopsis Information Service. 3 p 30
- 104 HIGKIN, 1950. Chlorophyll Studies on Barley Mutants. Plant. Physiol. 25 p 294-306
- 105 HIGKIN (HR) et FRENKEL (AW), 1962. Studies of Growth and Metabolism of a Barley Mutant Lacking Chlorophyll b. Plant. Physiol. 37 p 814-820
- 106 HIRONO (Y) et REDEI (GP), 1963. Multiple Allelic Control of Chlorophyll b Level in Arabidopsis thaliana. Nature (Lond.) 197 p 1324-1325
- 107 HOFFMANN (P), 1965. Chlorophyll Formation and Photosynthesis in Arabidopsis thaliana (L) Heynh. Arabidopsis Information Service 1 suppl. p 128-130
- 108 HOFFMANN (P) et IRMLER (R), 1966. Vitamin K_1 -Gehalt und Photosynthese bei Hoheren Pflanzen. Ber. Deut. Bot. Ges. 79 p 71-86
- 109 HOFFMANN (P), 1968. Zur Physiologie der Photosynthese bei höheren Pflanzen. Botan. Studien, Heft 8, 152 S - VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- 110 HOLDEN (M), 1970. Chlorophyll-bleaching Systems in Leaves Phytochemistry, 9 (8.) p 1771-1777
- 111 HOLM (G), 1954. Chlorophyll Mutation in Barley. Acta Agr. Scand. 4 p 457-471

- 112 HULETT -COWLING (M) et CAMPBELL (LL), 1971. Purification and Properties of an Alkaline Phosphatase of Bacillus licheniformis. Biochemistry 10(8) 1971 p 1364-1371
- 114 IZAWA (S) et GOOD (NE), 1969. The Inhibition of chloroplast photophosphorylation by p. Chloro-Mercuri-Benzoin and Mercuric Ion. Int. Congr. Photosynthesis Res. vol. III, p 1288
- 113 IVANKO (S) et INGVERSEN (J), 1971. Investigations on the Assimilation of Nitrogen by Maize Roots and the Transport of some Major Nitrogen Compounds by Xylem Sap. III Transport of Nitrogen compounds by Xylem Sap. Physiol. Plant., 24 (3), p 355-362
- 115 JACOBS (M), 1965. Isolement de Mutants Nutritionnels chez Arabidopsis thaliana. Méthodes et Résultats Préliminaires. Bull. Acad. Roy. Belgique 51 p 725-747
- 116 JACOBSON (L), 1951. Maintenance of Iron Supply in Nutrient Solutions by a Single Addition of Ferric Potassium EDTA. Plant. Physiol. 26 p 411-413
- 117 JAGELS (R), 1970. Photosynthetic Apparatus in Selaginella. Changes in Plastid Ultrastructure and Pigment Content under Different Light and Temperature Regimes. Can. J. Bot. 48 (10) p 1853-1860
- 118 JAIN (ML), 1966. A Biochemical Study of Yellow Virescens and Light Green Suppressor Mutations in Barley. Genetics 54 p 813-818
- 119 JOLCHINE (G), 1962. Le Métabolisme de l'Acide Acétique dans Feuilles de Bryophyllum Daigremontianum Berger. Bull. Soc. Chim. Biol. 44 p 337-363
- 120 JOLIVET (E), NICOL (M), BAUDET (J) et MOSSE (J), 1970. Différences dans l'Incorporation du $^{14}\text{CO}_2$ à la Lumière chez de Jeunes Maïs normal et opaque-2- Improving Protein by Nuclear Techniques (AIEA) p 391-401
- 121 JONES (RF) et CHEN (JH), 1970. Amino-acid Stimulation of Carbon Dioxide Fixation in Cell-free Extracts of Chlamydomonas Reinhardtii. Plant Physiol. 46 (5) p 761-762
- 122 KAZEMIE (M) et KLAMBT (D), 1969. Untersuchungen zur Wirkungsweise der Amino-säure Konjugate der Auxine in Wunden Geweben. Physiol. Plant 22 p 489-496
- 123 KAS'YANENKO (AG) et NASYROV (Yu.S), 1968. The Effect of Genetic Factors on the Photosynthetic Apparatus of Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH. Soviet Plant Physiol. 15 p 356-362
- 124 KASYANENKO (AG) et NASYROV (Yu. S), 1970. Leucine Requiring Biochemical Mutants of Arabidopsis thaliana. Arabidopsis Information Service
- 125 KECK (RW), DILLEY (RA), FREEMAN (C) et BIGGS (S), 1970. Chloroplast Composition and Structure Differences in a Soybean Mutant. Plant. Physiol. 46 (5) p 692-699
- 126 KETELLAPPER (HJ), 1963. Temperature Induced Chemical Defects in Higher Plant. Plant Physiology 38 (2) p 175-181
- 127 KHAU-VAN-KIEN (L), 1966. Etude Histochimique nouvelle au microscope des Chloroplastes Cellulaires. Essais de Caractérisation et de Localisation des Plastoquinones. Ann. chim. 11 p 51-62

- 128 KHAU-VAN-KIEN (L), 1962. Recherches Histochimiques Nouvelles au Niveau des Chloroplastes. Coll. Intern. CNRS. La Photosynthèse n° 119 p 423-438
- 129 KHAU-VAN-KIEN (L), 1966. New Histochemical Study at Cellular Chloroplast Level : Characterisation and Localization of Plastoquinones. Biochemistry of Chloroplasts, Vol. 2 p 545-550. Acad. Press.
- 130 KHAU-VAN-KIEN (L), 1968. Natural Phosphorylated Quinones. Intern. Cong. of Photosynth. Res., June 4-8, 1968 Freudenstadt, Germany. Preliminary Programs and Pre-prints p 133
- 131 KHAU-VAN-KIEN (L), 1968. Communications personnelles
- 132 KHAU-VAN-KIEN (L) et BOUNIAS (M), 1969. Détection Histochimique, Localisation et Caractérisation Cytocristallographique de quelques Acides Aminés Libres dans les Chloroplastes in Situ ou Isolés de Plantes Supérieures. Colloque interne CEA de Photosynthèse. p.70-73
- 133 KLEINKOPF (GE), HUFFAKER (RC) et MATHESON (A), 1970. A Simplified Purification and some Properties of Ribulose 1-5-Diphosphate Carboxylase from Barley. Plant Physiol. 46 p 204-207
- 134 KNIPL (YS) et KULAEVA (ON), 1970. Influence de la Coumarine et des Retardants Synthétiques de Croissance sur la Synthèse d'ARN et de Protéines dans les Feuilles coupées de l'Orge à l'obscurité et à la lumière (^{14}C). FIZIOL. RASTEN. SSSR, 17(3) p 549-557
- 135 KNOP (W), 1860. Ueber die Ernährung der Pflanzen Durch Wässerige Lösungen bei Ausschluss des Bodens. Landw. Vers. Stat. 2 p 270-272
- 136 KOSKI (VM) et SMITH (JHC), 1951. Chlorophyll Formation in a Mutant White Seedling 3. Arch. Biochem. Biophys. 34 p 189-195
- 137 KRUPKA (RM), 1971. Evidence for a Carrier Conformational Change Associated with Sugar Transport in Erythrocytes. Biochemistry 10 (7) p 1143-1153
- 138 KULAEVA (ON), FEDINA (AB) et KLYACHKO (NL), 1968. Specific Features of Protein Synthesis in Plant Leaves. Agrochimica 8 (1-2) p 1-9
- 139 KUO (MH) et BLUMENTHAL (HJ), 1962. Purification and Properties of an Acid Phosphomonoesterase from Neurospora Crassa. Biochym. et Biophys. Acta 52 p 13-29
- 140 LADZUNSKI (M), PETITCLERC (C), CHAPPELET (D) et LADZUNSKI (C), 1971. Flip-Flop Mechanisms in Enzymology. A Model : the Alkaline Phosphatase of Escherichia coli. Eur. J. Biochem., 20 (1), p 124-139
- 141 LAIBACH (F. Von), 1943. Arabidopsis thaliana (L.) Heynh als Objekt für Genetische Entwick Lungsphysiologische Untersuchungen. Bot. Arch. 44 p 439-455
- 142a LANG (F), VOROBYEVA (LM) et KRASNOVSKY (AA), 1969. Greening and Bleaching Processes in Mutant Maize Leaves. Progress in Photosynthesis Research, vol. II p 630-634
- 142b LANG (F), VOROBYEVA (LM) et KRASNOVSKII (AA), 1969. Study of greening of etiolated mutants of maize. Biokhimiia 34 (2) p 257-265

- 143 LANGRIDGE (J), 1955. Biochemical Mutations in the Crucifer Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Nature (Lond.) 176 p 260-261
- 144 LANGRIDGE (J), 1957. The Aseptic Culture of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Austral. J. Biol. Sci. 10 p 243-
- 145 LANGRIDGE (J), 1958. A Hypothesis of Developmental Selection Exemplified by Lethal and Semi-lethal Mutants of Arabidopsis. Austral. J. Biol. Sci. 11 p 58-68
- 146 LANGRIDGE (J), 1965. Temperature-sensitive Vitamine Requiring Mutants of Arabidopsis Thaliana. Austral. J. Biol. 18 p 311-321
- 147 LANGRIDGE (J) et GRIFFING (B), 1959. A study of High Temperature Lesions in Arabidopsis thaliana. Austral. J. Biol. 12 p 117-135
- 148 LANGRIDGE (J) et BROCK (RD), 1961. A Thiamine-requiring Mutant of the Tomato. Austr. J. Biol. Sci. 14 p 66-69
- 149 LANGRIDGE (J), 1963. Biochemical Aspects of Temperature Resistance. Ann. Rev. Plant. Physiol. 14 p 441-462
- 150 LATZKO (E) et GIBBS (M), 1969. Effect of O₂, Arsenite, Sulfhydryl Compounds and Light on the Activity of Ribulose 5-Phosphate Kinase. Progress in Photosynth. Research Vol. III p 1624-1630
- 151 LEVINE (RP), 1969. The Analysis of Photosynthesis Using Mutant Strains of Algae and Higher Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20 p 523-540
- 152 LEFORT (M), 1959. Etude de quelques Mutants Chlorophylliens induits chez Lycopersicum esculentum Mill. - Rev. Biol. Veg. 20 p 1-160
- 153 LEFORT (M), DURANTON (J), GALMICHE (JM) et ROUX (E), 1958. Génétique, Cytologique et Biochimique d'un Mutant Chlorophyllien de Tomate de type "Xantha" obtenu par Irradiation de Graines. Rapport CEA N° 1045 p 345
- 154 LIN (CY) et KEY (JL), 1970. Amino-acyl t-RNA Binding and Transferring Enzymes from Pea. Plant Physiol. 46 suppl. p 29
- 155 LINEWEAVER (H) et BURK (D), 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc., 56, p 658-666
- 156 LINNANE (AW) et STEWART (PR), 1967. Inhibition of Chlorophyll Formation in Euglena by Antibiotics which Inhibit Bacterial and Mitochondrial Protein Synthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 27 p 511
- 157 MAC CALDIN (DJ), 1960. The Chemistry of ninhydrin. Chem. Rev. 60 p 39-51
- 158 MAC LACHLAN (S) et ZALIK (S), 1963. Plastid Structure, Chlorophyll Concentration and free Amino-acids Composition of a Chlorophyll Mutant of Barley. Can. J. Bot. 41 p 1053-1062
- 159 MAJERNICK (O), 1970. A physiological study of the process of aging in Barley. Phytopathol. Z. 67 (1) p 15-20
- 160 MANS (RJ), 1966. A Light Effect on Amino-Acid and Nucleotide Incorporating Systems Derived from Higher Plants. Biochemistry of Chloroplast. p 351-369 - Ed. Goepp Academic Press

- 161 MARGULIES (MM), 1970. In Vitro Protein Synthesis by Plastids of Phaseolus vulgaris. V - Incorporation of ^{14}C Leucine into a Protein Fraction Containing Ribulose 1-5-diphosphate carboxylase. Plant. Physiol. 46 p 136-141
- 162 MARINI (P), 1965. Contribution à l'étude de la Rétention des Anions Phosphoriques par les Argiles. Thèse Docteur Ingénieur, Fac. Des Sc. Toulouse
- 163 MATSUDA (K), SIEGEL (A) et LIGHTFOOT (D), 1970. Variability in Complementarity for Chloroplastic and Cytoplasmic Ribosomal Ribonucleic Acids among Plant Nuclear Deoxy-ribonucleic Acids. Plant Physiol. 46 (1) p 6-12
- 164 MATTHEWS (JF), 1963. A Paper Chromatographic Study of North and South American Species of the Genus Tradescantia. L. Diss. Abstr. 24 p 46-47
- 165 MAXWELL (MAB) et BIDWELL (RGS), 1970. Synthesis of Asparagine from $^{14}\text{CO}_2$ in Wheat Seedlings. Can. J. Bot. 48 p 923-927
- 166 MICHAELIS (L) et MENTEN (ML), 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z., 49, p 333-369
- 167 MIKKELSEN (L), 1970. Drop-line Allocation of Areas in the Integration of Partially Resolved G. C. Peaks. Analytical Advances 3 (1) p 28-30
- 168 MIKSCH (JP) et BROWN (JAM), 1965. Development of Vegetative and Floral Meristems of Arabidopsis thaliana under Controlled Condition for Growth. Amer. J. Bot. 50 p 616-617
- 169 MITCHELL (P), 1966. Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. Biol. Rev. 41 p 445-502
- 170 MOOG (F), 1966. The regulation of alkaline phosphatase activity in the duodenum of the mouse from birth to maturity. J. Exp. Zool. 161 (3) p 353-367
- 171 MORTON (RK), 1958. The Phosphotransferase Activity of Phosphatases. 2 - Studies with Purified Alkaline Phosphomonoesterases and some substrate-specific Phosphatases. J. Biol. Chem. 70 p 139-149
- 172 MOYSE (A), 1966. Les Chloroplastes : Activité Photosynthétique et Métabolisme des Glucides. Biochemistry of Chloroplasts vol. II, Ed. Goodwin (Academic Press) p 92-127
- 173 NADLER (K) et GRANICK (S), 1970. Controls of Chlorophyll Synthesis in Barley. Plant Physiol. 46 (2) p 240-246
- 174 NAGY (AH) et FALUDI-DANIEL (A), 1967. On the Nature of Binding Forces Stabilizing Carotenoid-Protein and Chlorophyll-Protein Complexes in Vivo. Photosynthetica 1 p 69
- 175 NAKAMOTO (T) et VENNESLAND (B), 1960. The Enzymatic Transfer of Hydrogen. VIII - The Reactions Catalyzed by Glutamic and Isocitric Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 235 (1) p 202-204

- 176 NIKOLAEVA (MK) et OSIPOVA (OP), 1967. Effect of Chloramphenicol on the Synthesis of Chloroplast Proteins and the Photosynthetic Activity of Leaves. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 175 p 487
- 177 NIKOLAEVA (MK), OSIPOVA (OP) et NICHIPOROVICH (AA), 1969. Relations between Protein Metabolism and Photosynthetic Activity of the Photosynthetic Apparatus. Progress in Photosynthesis Research, vol. I p 409-418
- 178 NISHIYAMA (I) et MOTOYOSHI (F), 1966. Cytogenetic Studies in Avena, XVI - Chlorophyll Formation in Albino Oats under certain Culture Conditions. Japan. Genetics 41 (5) p 403-411
- 179 NYBOM (N), 1955. The pigment Characteristics of Chlorophyll Mutations in Barley. Hereditas 41 p 484-498
- 180 OAKS (BA), 1965. Synthesis of Asparagine in Corn Embryos. Plant. Physiol. 40 p 142
- 181 OAKS (A) et JOHNSON (FJ), 1970. Effect of Sugar on Amino-Acid Biosynthesis in Maize Root Tips. Can. J. Bot. p 117-124
- 182 OBENDORF (RL) et HUFFAKER (RC), 1970. Influence of Age and Illumination on Distribution of Several Calvin Cycle Enzymes in Greening Barley Leaves. Plant. Physiol. 45 p 579-582
- 183 OLSON (JM), THORNER (JP), KOENIG (DF), LEDBETTER (MC), OLSON et JENNINGS (MC), 1969. The Bacteriochlorophyll Protein of Green Photosynthetic Bacteria. Progress in Photosynthesis Research. Vol. I p 217-225
- 184 FERDRIET (E), DAMERON (P), GILLOT (J), DOMMERGUES (P) et MONTAUDO (C), 1965. Variations du Métabolisme des Acides Aminés Libres chez quelques Mutants Chlorophylliens de Blé de printemps. C. R. Acad. Sc. Paris t. 270 p 3189-3192
- 185 POMEROY (MK) et SIMINOVITCH (D), 1970. Seasonal Biochemical Changes in the Living Bark and Needles of red Pinus resinosa in Relation to Adaptation to Winter. Can. J. Bot. 48 (5) p 953-967
- 186 POPOV (K) et DILOVA (S), 1969. On the Dark Synthesis and Utilization of Chlorophylls. Progress in Photosynthesis Research vol. II p 606-610
- 187 PORTER (JW) et ANDERSON (DG), 1962. The Biosynthesis of Carotenoids. Arch. Biochem. & Biophys. 27 p 520-528
- 188 REDEI (GP), 1967. Biochemical Aspects of a Genetically Determined Variegation in Arabidopsis - Genetics 56 p 431-443
- 189 REDEI (GP), 1962. Genetic Block of "Vitamin Thiazole" Synthesis in Arabidopsis. Genetics 47 p 979
- 190 REDEI (GP), 1963. Somatic Instability caused by a Cysteine sensitive Gene in Arabidopsis. Science 139 p 767-769
- 191 RIBEREAU-GAYON (G), 1966. Etude du Métabolisme des Glucides des Acides Organiques et des Acides Aminés chez Vitis vinifera L. Thèse-Bordeaux 1966. p 65-6120-121

- 192 ROBBELEN (G), 1956. Über die Protochlorophyllreduktion in Einer Mutante von Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Planta 47 p 532-546
- 193 ROBBELEN (G), 1957. Eine Blattfarbmutante Ohne Chlorophyll b von Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Naturwiss 44 p 288-289
- 194 ROBBELEN (G), 1965. Plastom Mutations - Arabidopsis Inform. Service. 1 suppl. p 100 à 105
- 195 ROGERS (LJ), SHAH (SPJ) et GOODWIN (TW), 1966. Intra Cellular localization of Mevalonate-Activating Enzymes in Plant Cells. Biochem. J., 99, p 381-388
- 196 RUBIN, CERNAVINA et KRENDELVA, 1965. FIZIOL.RASTEN. 12 p 204-209
- 197 SAMORAJSKI (Ph.D.) et Mc CLOUD (J), 1961. Alkaline Phospho-esterase and Blood Brain Permeability. Laboratory Investigation 10 p 492-501
- 198 SANE (PV) et ZALIK (S), 1968. Amino-acids, Sugar and Organic Acid Content during Germination of Gateway Barley and its Chlorophyll-Mutants. Can. J. Biochem. 46 p 1479-1486
- 199 SANE (PV) et ZALIK (S), 1970. Metabolism of Acetate-2¹⁴C, Glycine 2-¹⁴C, leucine-U-¹⁴C and Effect of δ-amino-levulinic Acid on chlorophyll Synthesis in Gateway Barley and its mutant. Can. J. Bot. 48 p 1171-1178
- 200 SAPOSHNIKOV (W), 1889. Die Stärkebildung aus Zucker in den Laubblättern. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 7 p 258-260
- 201 SAPOSHNIKOV (DI), 1969. Transformation of Xanthophylls in the Chloroplast. Progress in Photosynthesis Research. vol. II p 694-700
- 202 SCHWARTZ (R), 1967. Effect of Glucose on the Synthesis of Chlorophyll and Carotenoïds by Jerusalem Artichoke Tissues Cultured in Vitro. C. R. Acad. Sc. Paris, D, 264 p 205
- 203 SCHNEIDER (HAW), 1969. Quantitative Determination of Chlorophyllides in Green and Etiolated Leaves. Progress in Photosynthesis Research. Vol. II p 552-554
- 204 SCHOFFER (WH) et GROB (E), 1952. Recherches sur les Inhibiteurs du Développement et de la Biogénèse des Caroténoïdes. I - La Streptomycine. Arch. des Sciences 5 (1) p 194-205
- 205 SCHWARTZ (D), 1949. The Chlorophyll Mutants of Maize. Bot. Gaz. 111 p 123-130
- 206 SEELY (GR) et DIEHN (B), 1969. Energetics of Chlorophyll-sensitized Oxidation-reduction Reactions. Progress in Photosynthesis Research. Vol. II p 728-732
- 207 SELTMAN (H), 1955. Comparative Physiology of Green and Albino Corn Seedlings. Plant. Physiol. 30 p 258-263
- 208 SESTAK (Z), 1962. On the Question of the Quantitative Relation between the Amount of Chlorophyll, its forms, and the Photosynthetic Rate. Coll. Int. CNRS. La Photosynthèse p 352-355

- 209 ŠESTÁK (Z) et ČATSKY (J), 1967. Sur les Relations entre le Contenu en Chlorophylle et l'Activité Photosynthétique pendant la croissance et le vieillissement des Feuilles du Chloroplaste. p 213-262 (Sironval, Ed. Masson)
(211 références bibliographiques).
- 210 SHAH (SPJ), ROGERS (LJ) et GOODWIN (TW), 1969. A proposed Role of Acetyl-CoA Synthesis in Chloroplast. Progress in Photosynthesis Research. Vol. II p 662-668
- 211 SHAH (SPJ) et COSSINS (EA), 1970. The Biosynthesis of Glycine and Serine by Isolated Chloroplasts. Phytochemistry 2 (7) p 1545-1551
- 212a SHLYK (AA) et NIKOLAYEVA (GN), 1962. The Demonstration of the Metabolic Appearance of the Heterogeneity of Chlorophylls in Vivo. Coll. Intern. CNRS. La Photosynthèse p
- 212b SHLYK (AA), GAPONENKO (VI), NIKOLAYEVA (GN), STANISHEVSKAYA LOSITSKAYA (TV) et SHEVCHUK (SN), 1969. Temperature Dependence of the Final Stages of Chlorophyll-metal in Green Plants. Fiziol. Rasten. SSSR., 16 (5) p 773-779
- 213 SIGNORET (A) et DURANTON (J), 1969. Absence of methionine in N-terminal positions in holochromic proteins of chloroplasts and etiolated plants of *Zea mays*. Bull. Soc. Chim. Biol. 51 (1) p 55-59
- 214 SIMONIS (W) et GRUBE (KH), 1953. Phosphate Economy and Photosynthesis. Z. Naturforsch. 8 p 312-313
- 215 SIMONIS (W) et GIMMLER (H), 1969. Effects of Inhibitors of Photophosphorylation on Light-induced Dark Incorporation of ^{32}P into *Ankistrodesmus braunii*. Progress in Photosynthesis Research. Vol. III p 1155-1161
- 216a SIRONVAL (C), 1953. A propos du métabolisme de la Chlorophylle dans les feuilles. Bull. Soc. Roy. Bot. Belg. 85 p 285
- 216b SIRONVAL (C) et MICHEL-WOLWERTZ (MR), 1962. Quelques particularités du Métabolisme des Chlorophylles. Coll. Intern. CNRS. La Photosynthèse. p 317-341
- 217 SMITH (JH), DURHAM et WURSTER, 1959. Formation and Bleaching of Chlorophyll in Albinos Corn Seedlings. Plant. Physiol. 34 p 340-345
- 218 SOSNA (M), 1962. The Origin of Radiomutants of the Chlorine in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Biol. Plant. 4 p 255-259
- 219 SPARROW (AH), BINNINGTON (JP) et POND (V), 1958. Bibliography on the effects of ionizing radiations on plants : 1896-1955. Biol. Dept Brookhaven Natl. Lab. Upton-New-York
- 220 SPOHR (HA) et GORHAM, 1933. The Culture of Albino Maize. Plant. Physiol. 17 p 397-410
- 221 STEIN (SS) et KOSHLAND (DE), 1952. Mechanism of Action of Alkaline Phosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 39 p 229-230

- 222 STENLID (G), 1970. Flavonoids as Inhibitors of the Formation of ATP in plant Mitochondria. Phytochemistry 9 p 2251-2256
- 223 STREETER (JG), 1970. Asparagine Biosynthesis in Higher Plants : Evidence for a Reaction Involving Glutamine as the Nitrogen Donor. Plant Physiol. 46 suppl. p 44
- 224a STUBBE, 1957. Kulturpflanzen 5 p 190-220
- 224b STUBBE, 1959. Kulturpflanzen 7 p 82-112
- 225 SVACHULOVA (J), 1967. Content of Total Chlorophyll and free Amino-acids of the Chlorina Mutants of Arabidopsis thaliana in artificial glucose nutrition. Biol. Plant. 9 p 34-40
- 226 TANENBAUM (SW) et SHEMIN (D), 1950. Fed. Proc. 9 p 236
- 227 TEMPE (J), 1966. Analyse des Amino-acides par Chromatographie. Une Méthode Rapide d'Intégration Manuelle. J. Chromatogr. 24 p 169-174
- 228 TEAS (H), 1957. Physiological Genetics. Ann. Rev. Plant. Physiol. 8 p 393-412
- 229 THOMAS (JB) et BARTELS (CT), 1966. Studies of Chlorophyll-Complexes in Vivo. Biochemistry of Chloroplasts. Ed. Goodwin. Vol. I p 263-267
- 230 TRAVIS (RL), JORDAN (WR) et HUFFAKER (RC), 1969. Evidence for an Inactivating System of Nitrate Reductase in Hordeum vulgare L. During Darkness, that Requires Protein Synthesis. Plant. Physiol. 44 p 1150
- 231 TREMOLIERES (A), 1971. Mise en Evidence dans la Feuille de Trèfle d'une Fraction Lipidique à Renouvellement Rapide et d'une Fraction Riche en Acide Linoléique à Renouvellement très lent. C. R. Acad. Sc. Paris t 272, D, p 2777-2780
- 232 UTECH (IM), GARTHREID (K) et HOLDEN (JT), 1970. Properties of a Dicarboxylic Amino-acid Transport-deficient Mutant of Streptococcus faecalis. J. Biol. Chem. 245 (20) p 5273-5280
- 233 VELEMINSKY (J) et RÖBBELEN (G), 1965. Chlorophyll Formation and Fine Structure of Chloroplasts in a Chlorina Mutant of Arabidopsis thaliana. Arabid. Inf. Serv., 1 p 131-137
- 234 VELEMINSKY (J), SVACHULOVA (J) et GICHNER (T), 1965. Free Amino-acids in the Chlorophyll-mutants of Arabidopsis thaliana and Hordeum vulgare. Proc. Symp. "Induction of Mutations and the Mutation. Process. Praha, 27-29 sep p 57-61
- 235 VELEMINSKY (J), 1966. Relations between Chlorophyll Content and Chloroplast Fine Structure in a Chlorina Mutant of Arabidopsis thaliana. Planta 68 p 15-35
- 236 VERNON (LP), DE (B), MOLLENHAUER (HH) et SHAW (ER), 1969. Composition and Structure of Spinach Subchloroplast Fragments Obtained by the Action of Triton X-100. Progress in Photosynthesis Research. Vol. I, p 137-148
- 237 WALLACE (RH) et SCHWARTIG (AE), 1954. A Study of Chlorophyll in a White Mutant Strain of Helianthus Annuus. Plant. Physiol. 29 p 431-436
- 238 WALKER (TS) et BAILEY (JL), 1970. Two photoreversible chromoproteins from etiolated oat seedlings. Biochem. J. 120 (3) p 607-612

- 239 WARBURG (O), KRIPPAHL et LEHMANN, 1968. Dialysierte Chlorella ein Neues Versuchsmaterial Zur Untersuchungen der Photosynthese. Z. für Naturforschung 23 p 1076-10
- 240 WARNER (HR), TULEEN (NA), BELL (WD) et SNYDER (LA), 1969. Effect of a Virido Xantha Mutation in Barley on the Content of Individual Plastid-pigments. Molecular & General Genetics 104 (3) p 241-252
- 241a WASSINK (EC), 1953. Phosphate Exchange Accompanying Photosynthesis. Proc. Int. Congr. Bot. Stockholm 7 p 746-7
- 241b WASSINK (EC) et ROMBACH (J), 1954. Phosphate Metabolism in Induction Phase of Photosynthesis in Chlorella. Fr. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap 57 p 493-497
- 242 WELLS (G) et HAGEMAN (RH), 1970. The Conversion of NADPH to NADH by Phosphatase Activity in Extracts of Green Leaves. Plant. Physiol. 46 Suppl. p 45
- 243 WESSELS (JSC), 1958. Photosynthetic Phosphorylation - II - Bioch. et Biophys. Acta 29 p 113-123
- 244 WESSELS (JSC), 1959. Photosynthetic Phosphorylation - III - Relations between Photosynthetic Phosphorylation and Reduction of TPN by Chloroplasts. Bioch. & Biophys. Acta 35 p 53-64
- 245 WEAVER (P), 1971. Temperature-sensitive Mutations of the Photosynthetic Apparatus of Rhodospirillum rubrum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 (1) p 136-138
- 246 WHITAKER (TW), 1952. Genetic and Chlorophyll Studies of a Yellow-green Mutant in Muskmelon. Plant. Physiol. p 263-268
- 247 WILD (A) et EGLE (K), 1968. The Size of the Photosynthetic and its Variability - IV - On the relationship between CO₂ Fixation and Chlorophyll-content of a Chlorella Mutant. Photosynthetica 2 (4) p 253-260
- 248 WILLIAMS (GR) et WILLIAMS (AS), 1970. Hybridization of Bean Leucyl-ARNt with Nuclear and Chloroplast DNA'S. Plant. Physiol. 46(suppl) p 30
- 249 WU (L), WU (RY), LI (HW) et CHU (PN), 1969. Influence of Wilt Leaf Disease of Sugarcane on the Chloroplast Development and Chlorophyll Biosynthesis. Botanical Bulletin of Academia Sinica 10(1) p 23-28
- 250 WYK (D. Van), 1967. Carbohydrates in Structural Proteins of Chloroplasts from Allium Porrum. Z. Naturforsch 22 p 692
- 251 YAMAGUCHI (S) et ISLAM (AS), 1967. Translocation of Eight ¹⁴C labeled Amino-acids and three Herbicides in two Varieties of Barley. Hilgardia, 38 (5) p 207-229
- 252 YAMAMOTO (HY), CHANG (JL) et AIHARA (MS), 1967. Light-induced Interconversion of Violaxanthin and Zeaxanthin in New-Zealand Spinach-leaf Segments. Biochim. & Biophys. Acta 111 p 342
- 253 YEMM (EW), 1969. Photorespiration and Photosynthesis in Young Leaves of Barley. Progress in Photosynthesis Research vol. I, p 474-481
- 254 ZARIN (VE) et BOICHENKO (EA), 1969. Non Heme Iron Compounds in the Metabolism of Leaves. Fiziol. Rasten 16 (3) p 408-413
- 255 ZARIN (VE) et FAUST (M), 1969. Pear Bud Metabolism : Seasonal Changes in Glucose Utilization. Plant Physiology 44 p 1273-1276

HORS TEXTE

RESULTATS NUMERIQUES

FIGURES

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

RESULTATS NUMERIQUES

ARABIDOPSIS - ETUDE DES PLANTS TEMOINS

Tableau I - Variations des teneurs en pigments chlorophylliens en fonction de l'âge chez Arabidopsis (nM/mg de poids frais)
(N = 5)

Age (jours)	Chlor. (a)	Chlor. (b)	Chlor. (a + b)	Phéophytines
-18	0,748 $\pm$ 0,16	0,36 $\pm$ 0,03	1,108 $\pm$ 0,02	0,00
	1,020 $\pm$ 0,11	0,513 $\pm$ 0,088	1,533 $\pm$ 0,06	0,048
	1,010 $\pm$ 0,16	0,506 $\pm$ 0,05	1,516 $\pm$ 0,22	
	0,84 $\pm$ 0,02	0,494 $\pm$ 0,11	1,334 $\pm$ 0,11	0,147
-39	0,616 $\pm$ 0,056	0,352 $\pm$ 0,11	0,968 $\pm$ 0,11	
	0,448 $\pm$ 0,1	0,231 $\pm$ 0,044	0,679 $\pm$ 0,11	0,040
	0,36 $\pm$ 0,036	0,162 $\pm$ 0,014	0,522 $\pm$ 0,05	0,023

Tableau II - Variations des teneurs en caroténoïdes en fonction de l'âge chez Arabidopsis (nM/mg de poids frais) (N = 5)

Age (jours)	β Carotène	Lutéine	Viola-Xanthine	Néo-Xanthine
3	0,087 $\pm$ 0,015	0,188 $\pm$ 0,026	0,089 $\pm$ 0,018	0,048 $\pm$ 0,005
7	0,124 $\pm$ 0,020	0,234 $\pm$ 0,026	0,100 $\pm$ 0,012	0,052 $\pm$ 0,005
14	0,138 $\pm$ 0,020	0,250 $\pm$ 0,026	0,110 $\pm$ 0,012	0,056 $\pm$ 0,015
25	0,142 $\pm$ 0,020	0,256 $\pm$ 0,010	" "	0,058 $\pm$ 0,015
38	0,057 $\pm$ 0,010	0,130 $\pm$ 0,013	0,070 $\pm$ 0,004	0,033 $\pm$ 0,005
52	0,054 $\pm$ 0,020	0,109 $\pm$ 0,013	0,047 $\pm$ 0,012	0,029 $\pm$ 0,002
65	0,046 $\pm$ 0,011	0,091 $\pm$ 0,013	0,037 $\pm$ 0,005	0,021 $\pm$ 0,002

ARABIDOPSIS - ETUDE DES PLANTS TEMOINS

Tableau III - Evolution des teneurs en amino-acides au cours du développement des rosettes de feuilles d'Arabidopsis

Amino-acides ($\mu\text{M/g}$)	Composition et teneurs aux stades suivants			
	13 jours	17/18 jours	21 jours	24 jours
Ornithine	0,037 $\pm$ 0,004	0,053 $\pm$ 0,004	0,017	0,01
Lysine	0,077 $\pm$ 0,005	0,046 $\pm$ 0,002	0,133	0,05
Histidine	0,067 $\pm$ 0,015	0,061 $\pm$ 0,004	0,044	0,06
Arginine	0,104 $\pm$ 0,024	0,23 $\pm$ 0,016	0,131	0,04
Ac. Aspartique	0,86 $\pm$ 0,003	0,13 $\pm$ 0,002	0,875	0,57
Asparagine		0,32 $\pm$ 0,003		
Sérine	1,20 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,07	0,92	0,86
Glycocolle	0,38 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,03	0,29	1,9
Ac. Glutamique	2,37 $\pm$ 0,07	0,82 $\pm$ 0,07	1,92	2,35
Glutamine		0,9 $\pm$ 0,07		
Thréonine	1,24 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,016	1,5	1,63
Alanine	0,68 $\pm$ 0,014	0,57 $\pm$ 0,01	1,13	0,75
GABA	0,165 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,016	0,577	0,28
Proline	0,315 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,03	0,172	0,04
Méthionine	0,063 $\pm$ 0,007	0,048 $\pm$ 0,011	0,151	0,03
Valine	0,12 $\pm$ 0,005	0,087 $\pm$ 0,005	0,091	0,12
Tyrosine	0,044 $\pm$ 0,002	0,027 $\pm$ 0,003	0,025	0,03
Iso-leucine	0,053 $\pm$ 0,003	0,040 $\pm$ 0,005	0,040	0,05
Leucine	0,068 $\pm$ 0,005	0,056 $\pm$ 0,007	0,059	0,06
Phényl-ala.	0,095 $\pm$ 0,014	0,065 $\pm$ 0,007	0,046	0,05
Tryptoph.	0,023	0,014	0,005	0,02
Nombre de plants extraits	104	51	15	23

Tableau IV - Evolution des teneurs en sucres libres au cours du développement chez Arabidopsis (nM/mg)

Sucres	Stades	13 jours	17 jours	24 jours
Lactose		0,167 $\pm$ 0,02	0,079 $\pm$ 0,014	0,143 $\pm$ 0,01
Maltose		0,268 $\pm$ 0,08	0,278 $\pm$ 0,10	0,42 $\pm$ 0,05
Glucose		3,15 $\pm$ 0,3	1,83 $\pm$ 0,3	2,65 $\pm$ 0,4
Fructose		1,0 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,03	1,55 $\pm$ 0,05
Polyholoside 1 (en u.i./mg)		31,5 $\pm$ 0,5	23,5 $\pm$ 2,5	28,5 $\pm$ 3,5
Polyholoside 2 (en u.i./mg)		4,45 $\pm$ 0,9	4,45 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 1,5

ARABIDOPSIS - ETUDE DES MUTANTS

Tableau V - Teneurs en amino-acides libres dans les rosettes d'Ara-
bidopsis normales et mutées, au stade d'apparition des
hampes florales (nM/mg)

Amino-Acides	Teneurs en nM/mg au stade hampes visibles		Rapport $\frac{M}{T}$ %
	Mutants	Témoins	
Ornithine	0,086	0,053	102
Lysine	0,087	0,046	190
Histidine	0,060	0,061	100
Arginine	0,16	0,23	69,5
Ac. Aspartique	0,233	0,13	180
Asparagine	0,558	0,32	175
Sérine	0,976	0,93	105
Glycocolle	0,31	0,50	65
Ac. Glutamique	1,11	0,90	123
Glutamine	0,90	0,82	110
Thréonine	1,235	0,90	137
Alanine	0,80	0,57	141
Proline	0,197	0,24	82
Valine	0,087	0,087	100
Méthionine	0,090	0,048	187
Tyrosine	0,044	0,027	163
Iso-leucine	0,036	0,040	91
Leucine	0,045	0,056	81
Phényl-ala.	0,087	0,065	134
Tryptoph.	0,0065	0,014	46,5

ARABIDOPSIS - ETUDE DES MUTANTS

Tableau VI - Variations de teneurs en phosphates chez les Mutants et les Témoins d'Arabidopsis ($\mu\text{g/g}$ de poids frais)

Ages jours	Poids Moyen mg/pl	Ph. minéral libre	Phosphates organiques		Phosphates total
			Hydrosoluble	Ethérosoluble	
24	9,6	174	68	60	302
33	14,1	250	20	75	345

Tableau VII - Variations de teneurs en amino-acides libres chez Arabidopsis après atténuation de lumière : phase 1, 5 H à 25 lux (nM/mg)

Amino-Acides	Plants normaux	Mutants
Ornithine	0,05 $\pm$ 0,015	0,062
Lysine	0,11 $\pm$ 0,05	0,27
Histidine	0,08 $\pm$ 0,005	0,141
Arginine	0,3 $\pm$ ϵ	0,384
ASP + ASP-NH ₂	0,97 $\pm$ 0,005	1,41
Sérine	0,98 $\pm$ 0,2	1,03
Glycocolle	0,24 $\pm$ 0,03	0,269
GLU + GLU-NH ₂	2,14 $\pm$ 0,02	2,35
Thréonine	0,93 $\pm$ 0,04	2,24
Alanine	0,83 $\pm$ 0,05	0,937
Proline	0,34 $\pm$ 0,03	0,252
Valine	0,24 $\pm$ 0,03	0,268
Méthionine	0,056 $\pm$ 0,02	0,118
Iso-leucine	0,165 $\pm$ 0,01	0,194
Leucine	0,23 $\pm$ 0,04	0,177
Phényl-alanine	0,11 $\pm$ 0,01	0,169

ARABIDOPSIS - ETUDE DES MUTANTS

Tableau VIII - Variations de teneurs en amino-acides libres chez les témoins d'Arabidopsis maintenus en lumière atténuée prolongée (17 H à 9,5 lux) (nM/mg)

Amino-Acides	T. Lumière normale	T. 5H sous 11 lux	T. 24H sous 9,5 lux
Ornithine	0,227	0,175	0,228
Lysine	0,101	0,21	0,287
Histidine	0,069	0,315	0,398
Arginine	0,0627	0,312	0,411
Ac. Aspart.	0,283	0,68	0,492
Asparagine	0,348	0,654	3,14
Sérine	0,40	0,693	0,967
Glycocolle	0,295	0,512	0,582
Ac. Glutam.	0,933	1,462	1,596
Glutamine	0,847	1,05	1,38
Thréonine	0,423	0,798	0,806
Alanine	0,703	1,31	1,44
Ac. γ Am. But.	0,189	0,316	0,285
Proline	0,149	0,116	0,081
Ac. α Am. But.	0,015	0,295	0,333
Valine	0,104	0,212	0,325
Méthionine	0,05	0,125	0,175
Iso-leucine	0,048	0,163	0,25
Leucine	0,060	0,262	0,525
Phényl-ala.	0,060	0,125	0,218
Tryptoph.	0,021	0,057	0,057

Tableau IX - Variations de teneurs en sucres libres chez Arabidopsis (témoins et mutants) en lumière normale et atténuée (nM/mg)

Sucres	Témoins		Mutants	
	L. N.	L. A.	L. N.	L. A.
Glucose	2,0	2,16	1,55	2,0
Fructose	1,77	1,66	1,50	1,16
Saccharose	0,45	0,642	0,362	0,549

ORGE - ETUDE DES PLANTS TEMOINS

Tableau X - Croissance d'un lot de plants d'Orge Témoins (N = 24)

Ages	2 j	4 j	6 j	8 j	10 j	12 j	14 j
C mm	41	119	175	189	201	202	203
F(1) mm	-	67	95	160	187	238	250
F(2) mm	-	-	-	-	41	75	149
Poids total mg	-	120	-	216	-	346	573

Tableau XI - Poids des organes séparés chez l'Orge (Témoins)

Stades	4 jours		8 jours		12 jours		14 jours		
Organes	C	F(1)	C	F(1)	C	F(1)	C	F(1)	F(2)
Poids (mg)	110	10	175	41	226	120,5	230	233,5	149

ORGE - ETUDE DES PLANTS TEMOINS

Tableau (XII) - Evolution des teneurs en amino-acides libres chez l'Orge en fonction du développement et de l'éclairement (nM/mg poids frais)

Composés	Stade 8 jours	Stade 12 j.	Stade 24 j.	Stade 31 j.	Stade 8 j.
Eclairement	1900 lux 15H/24	1900 lux 15H/24	1900 lux 15H/24	1900 lux 15H/24	3000 lux 19H/24
Proline	0,48	0,44	0,864	1,19	0,80
Serine	1,05	0,646	0,46	0,43	0,89
Arginine	0,80	0,55	0,40	0,38	0,18
Glutamine	0,75	0,41	0,35	0,30	0,123
Aspart.	0,76	0,49	0,29	0,38	0,23
Paragine	2,85	2,52	0,27	1,10	1,71
Alanine	0,70	0,66	0,46	0,29	0,34
Cystocollé	0,95	0,61	0,26	0,35	0,42
Glutam.	1,49	1,02	0,42	0,44	0,31
Putamine	0,95	0,51	0,681	0,73	0,41
Oréonine	0,83	0,51	0,29	0,17	0,565
Valine	1,33	0,715	0,79	0,50	0,987
Am. But.	0,63	1,07	0,92	0,42	0,71
Glycine	0,10	0,238	0,11	-	-
Thionine	0,94	0,542	0,41	0,30	0,39
Thionine	0,122	0,37	0,17	0,16	-
o-leucine	0,35	0,348	0,114	0,08	0,14
Isoleucine	0,30	0,21	0,219	0,11	0,267
Phényl-ala.	0,138	0,136	0,086	0,22	0,184
Tryptoph.	0,105	0,123	0,163	0,186	0,276
Pro. (a)	0,53	0,64	0,845	0,825	1,10
Pro. (b)	0,283	0,39	0,555	0,493	0,65

ORGE - ETUDE DES MUTANTS VIRIDIS : STADES 8 ET 12 JOURS

Tableau (XIII) - Croissance des plants d'Orge normaux et mutés aux stades 8 jours et 12 jours (N = 6)

Stade 8 jours	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
C (mm)	183 ± 20	207 ± 15	193 ± 15	192 ± 15
F(1) (mm)	188 ± 25	193 ± 20	127,5 ± 5	126 ± 5

Organes :	Témoins 12j	V ₁ 12j	V ₂ 12j	V ₃
C (mm)	184 ± 20	210 ± 5	198 ± 15	201 ± 6
F(1) (mm)	260 ± 30	257 ± 15	182,5 ± 2,5	173,5 ± 13

Tableau (XIV) - Comparaison des teneurs pigmentaires des plants d'Orge témoins et mutants, au stade 8 jours (nM/mg poids fr)

Plants	Chl.(a)	Chl. (b)	Carotène	Lutéine	Viola-X.	Néo-Xa
Témoins	0,63	0,33	0,094	0,137	0,063	0,04
V ₁	0,41	0,255	0,060	0,115	0,059	0,03
V ₂	0,56	0,35	0,087	0,138	0,065	0,03
V ₃	0,30	0,21	0,068	0,068	0,048	0,02

Tableau (XV) - Comparaison des teneurs pigmentaires des plants d'Orge témoins et mutants au stade 12 jours (nM/mg poids fr)

Pigments	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Chlor. (a)	0,68	0,343	0,374	0,50
Chlor. (b)	0,384	0,21	0,233	0,290
Carotène	0,122	0,06	0,076	0,072
Lutéine	0,293	0,147	0,23	0,225
Viola-X.	0,142	0,073	0,115	0,10
Néo-Xanth.	0,0764	0,021	0,050	0,045

Tableau (XVI) - Teneurs comparées en amino-acides libres des plants d'Orge normaux et mutants viridis au stade 8 jours (nM/mg)

Amino-acides	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Glycine	0,48 ± 0,18	0,50 ± 0,10	0,56 ± 0,19	0,60 ± 0,28
Alanine	1,05 ± 0,2	1,03 ± 0,3	1,21 ± 0,17	1,16 ± 0,2
Glutidine	0,80 ± 0,15	1,02 ± 0,2	1,19 ± 0,13	1,11 ± 0,2
Valine	0,75 ± 0,2	0,84 ± 0,2	1,05 ± 0,2	0,93 ± 0,2
Aspart.	0,756 ± 0,2	1,074 ± 0,2	1,35 ± 0,17	1,15 ± 0,1
Paragine	2,85 ± 0,1	4,25 ± 0,2	4,83 ± 0,12	4,5 ± 0,3
Proline	0,70 ± 0,16	0,637 ± 0,2	0,90 ± 0,15	0,89 ± 0,15
Coccolle	0,95 ± 0,4	1,01 ± 0,3	1,15 ± 0,2	1,21 ± 0,05
Glutam.	1,5 ± 0,1	1,69 ± 0,4	1,91 ± 0,17	1,87 ± 0,23
Glutamine	0,95 ± 0,02	0,96 ± 0,07	1,17 ± 0,25	1,11 ± 0,12
Sérine	0,83 ± 0,15	1,05 ± 0,15	1,21 ± 0,03	1,1 ± 0,03
Leucine	1,33 ± 0,16	1,46 ± 0,3	1,61 ± 0,14	1,43 ± 0,19
γ-Am. But.	0,63 ± 0,15	0,68 ± 0,16	0,95 ± 0,2	0,73 ± 0,22
Asparagine	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,008	0,12 ± 0,02	0,087 ± 0,037
Glutamine	0,94 ± 0,09	1,43 ± 0,13	1,76 ± 0,11	1,72 ± 0,02
Cystéionine	0,122 ± 0,03	0,065 ± ε	0,105 ± ε	0,133 ± 0,03
β-leucine	0,35 ± 0,1	0,75 ± 0,15	0,53 ± 0,08	0,79 ± 0,16
Valine	0,30 ± 0,1	0,68 ± 0,12	0,42 ± 0,14	0,57 ± 0,2
Phényl-ala.	0,14 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,122 ± 0,003	0,17 ± 0,015
Tryptoph.	0,105 ± 0,05	0,25 ± 0,04	0,19 ± 0,036	0,26 ± 0,038

Tableau (XVII) - Teneurs comparées en sucres libres dans les plants d'Orge normaux et mutants viridis au stade 8 jours (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Saccharose	0,19	0,23	0,12	0,27
Glucose	5,6	8,4	5,6	3,1
Fructose	2,94	3,5	3,8	3,5
Ribose	0,24	0,30	0,26	0,213

Tableau (XVIII) - Teneurs comparées en amino-acides libres des plants d'Orge normaux et mutés, au stade 12 jours (nM/mg)

Amino-Acides	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Ornithine	0,44	0,43	0,45	0,75
Lysine	0,65	0,605	0,56	1,07
Histidine	0,55	0,83	1,25	0,614
Arginine	0,41	0,69	0,67	0,73
Ac. Aspart.	0,49	0,77	0,89	0,90
Asparagine	2,52	5,70	9,05	8,24
Sérine	0,66	0,78	0,85	0,83
Glycocolle	0,61	0,64	0,76	0,68
Ac. Glutam.	1,02	1,16	1,06	1,21
Glutamine	0,51	0,596	0,562	0,655
Thréonine	0,51	0,64	0,65	0,88
Alanine	0,71	0,68	0,756	0,95
Ac. γ Am. But.	1,07	0,81	0,64	0,77
Proline	0,24	0,184	0,206	0,187
Ac. α Am. But.	0,118	0,139	0,092	0,096
Valine	0,542	0,825	0,612	0,708
Méthionine	0,374	0,432	0,218	0,243
Iso-leucine	0,348	0,29	0,265	0,32
Leucine	0,210	0,225	0,151	0,117
Phényl-ala.	0,136	0,22	0,122	0,056
Tryptoph.	0,123	0,336	0,387	0,438

Tableau (XIX) - Teneurs comparées en sucres libres dans les plants d'Orge normaux et mutés au stade 12 jours (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Glucose	4,67	4,68	4,80	6
Fructose	3,03	3,47	3,54	4,3
Ribose	0,153	0,21	0,18	0,26

Tableau (XX) - Variations de teneurs en pigments et cofacteurs dans les plants d'Orge normaux et mutés après une courte atténuation de lumière : 5 H - 11 lux (nM/mg)

Produits	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Chlor. (a)	0,47	0,30	0,268	0,21
Chlor. (b)	0,254	0,155	0,187	0,216
Carotène	0,096	0,115	0,0746	0,111
Lutéine	0,238	0,202	0,181	0,178
Viola-X.	0,093	0,085	0,0575	0,062
Néo-Xanth.	0,021	0,0276	0,0157	0,024
Phéophytines	0,186	0,25	0,186	0,364
Tocophéryl-chroménol	3,27	2,90	1,45	3,18

Tableau (XXI) - Variations des teneurs pigmentaires chez l'Orge, témoins et mutants après atténuation prolongée de lumière : 17 H - 9,5 lux (nM/mg)

Pigments	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Chlor. (a)	0,693	0,718	0,478	0,631
Chlor. (b)	0,523	0,514	0,292	0,424
Phéophyt.	0,027	0,031	0,134	0,035
Carotène	0,186	0,153	0,127	0,137
Lutéine	0,253	0,274	0,190	0,248
Viola-X.	0,151	0,171	0,0845	0,127
Néo-Xanth.	0,099	0,098	0,064	0,087

Tableau (XXII) - Evolution des cofacteurs chez l'Orge, témoins et mutants après atténuation prolongée de lumière (nM/mg)

Composés	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Toco-chroménol	2,42	1,37	2,58	4,12
Chroménol-2	0,89	0,81	1,35	1,91
Chroménol-3	0,46	0,26	0,64	1,16
Plasto-Chroménol	11,3	9,7	11,34	10,75

Tableau (XXIII) - Variations des teneurs en amino-acides libres chez les plants d'Orge normaux et mutés placés en lumière atténuée de courte durée (nM/mg)

Amino-Acides	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Ornithine	0,67	0,63	0,71	0,75
Lysine	0,60	0,573	0,686	0,69
Histidine	0,58	0,62	0,83	0,797
Arginine	0,64	0,60	0,55	0,59
Ac. Aspart.	0,79	0,80	0,89	0,82
Asparagine	2,62	2,45	4,55	3,36
Sérine	0,40	0,40	0,66	0,61
Glycocolle	0,87	1,26	0,93	1,05
Ac.Glutam.	1,00	0,916	0,927	1,12
Glutamine	0,515	0,48	0,526	0,555
Thréonine	0,637	0,50	0,61	0,76
Alanine	0,69	0,56	0,67	0,70
Ac. γ Am. But.	0,70	0,625	0,537	0,72
Proline	0,24	0,27	0,23	0,19
Ac. α Am. But.	0,068	0,064	0,05	0,047
Valine	0,382	0,38	0,55	0,43
Iso-leucine	0,352	0,437	0,456	0,512
Leucine	0,182	0,184	0,234	0,313
Phényl-ala.	0,06	0,057	0,057	0,106
Tryptoph.	0,024	0,054	0,050	0,048

Tableau (XXIV) - Comparaison des teneurs en sucres libres des plants d'Orge normaux et mutés, en lumière atténuée de courte durée (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Glucose	3,31	3,2	2,37	1,95
Fructose	2,2	2,6	1,90	1,55
Ribose	0,134	0,146	0,140	0,160

Tableau (XXV) - Variations des teneurs en amino-acides libres chez les plants d'Orge normaux et mutés placés en lumière atténuée prolongée (nM/mg)

Amino-Acides	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Ornithine	0,537	0,60	0,437	0,41
Lysine	0,917	1,00	0,61	0,54
Histidine	0,71	0,80	0,787	0,762
Arginine	0,667	0,682	0,825	0,83
Ac. Aspart.	0,760	0,772	0,59	0,684
Asparagine	5,82	5,70	6,5	5,72
Sérine	0,747	0,945	1,08	0,912
Glycocolle	0,425	0,432	0,367	0,482
Ac. Glutam.	1,14	1,29	1,21	1,15
Glutamine	1,14	1,085	0,928	0,936
Thréonine	0,72	0,76	0,667	0,60
Alanine	1,14	1,27	1,06	0,916
Ac. γ Am. But.	1,39	0,89	0,495	0,381
Proline	0,18	0,13	0,043	0,076
Ac. α Am. But.	0,187	0,15	0,124	0,105
Valine	1,00	0,85	0,74	0,635
Méthionine	0,467	0,36	0,26	0,30
Iso-leucine	0,81	0,765	0,45	0,49
Leucine	0,578	0,514	0,351	0,424
Phényl-ala	0,24	0,16	0,13	0,19
Tryptoph.	0,33	0,40	0,28	0,46

Tableau (XXVI) - Variations des teneurs en sucres libres chez les plants d'Orge normaux et mutés placés en lumière atténuée prolongée (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Saccharose	0,155	0,111	0,073	0,0642
Glucose	3,88	4,75	3,3	2,37
Fructose	2,22	2,51	2,28	1,68
Ribose	2,26	1,82	1,55	1,64

Tableau (XXVII) - Composition en amino-acides libres de la 1ère feuille des plants d'Orge normaux et mutés après ablation de la feuille cotylédonnaire (nM/mg)

Amino-Acides	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Ornithine	0,53	0,39	0,38	0,47
Lysine	0,94	0,87	0,90	1,14
Histidine	0,76	0,79	0,97	1,08
Arginine	0,64	0,65	0,90	0,91
Ac. Aspart.	0,94	1,11	1,32	1,53
Asparagine	4,1	3,14	4,7	4,68
Sérine	0,90	0,98	1,03	1,22
Glycocolle	0,84	0,79	1,09	1,047
Ac. Glutam.	1,43	1,367	1,370	1,41
Glutamine	0,92	0,89	0,95	1,05
Thréonine	1,237	1,237	1,147	1,41
Alanine	1,38	1,31	1,39	1,50
Ac. γ Am. But.	0,58	0,576	0,50	0,51
Proline	0,29	0,34	0,45	0,54
Valine	1,95	1,77	1,56	1,575
Méthionine	0,29	0,16	0,136	0,132
Tyrosine	0,25	0,134	0,127	0,11
Iso-leucine	1,585	1,462	0,84	0,88
Leucine	0,735	0,594	0,406	0,39
Phényl-ala.	0,237	0,265	0,172	0,221
Tryptoph.	1,032	1,08	1,31	1,74

Tableau (XXVIII) - Composition en sucres libres de la 1ère feuille des plants d'Orge normaux et mutés après ablation de la feuille cotylédonnaire (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Saccharose	0,17	0,20	0,14	1,32
Glucose	8,88	6,43	7,16	9,16
Fructose	4,88	4,07	4,85	4,5
Ribose	0,122	0,054	0,865	0,11

Tableau (XXIX) - Teneurs pigmentaires dans les plants d'Orge normaux et mutés cultivés à basse température (nM/mg)

Pigments	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Chlor. (a)	0,588	0,426	0,39	0,57
Chlor. (b)	0,343	0,34	0,31	0,25
Carotène	0,163	0,083	0,0847	0,127
Lutéine	0,234	0,204	0,17	0,20
Viola-X.	0,151	0,104	0,0757	0,122
Néo-Xanth.	0,058	0,047	0,040	0,059

Tableau (XXX) - Teneurs en amino-acides libres dans les plants d'Orge normaux et mutés cultivés à basse température (nM/mg)

Amino-Acides	T	V ₁	V ₂	V ₃
Ornithine	0,64	0,66	1,15	1,03
Lysine	0,81	0,88	1,30	1,14
Histidine	0,82	0,94	1,50	1,34
Ac. Aspart.	0,57	0,50	0,86	0,87
Asparagine	6,0	6,0	9,77	10,12
Sérine	0,83	0,90	1,68	1,46
Glycocolle	0,96	1,01	1,01	0,97
Ac. Glutam.	1,45	1,43	1,46	1,55
Glutamine	0,83	0,735	0,93	0,97
Thréonine	0,335	0,406	0,70	0,59
Alanine	0,74	0,54	1,056	0,80
Ac. γ Am. But.	0,855	0,54	0,46	0,64
Proline	0,13	0,137	0,127	0,088
Ac. α Am. But.	0,23	0,16	0,183	0,18
Valine	1,26	0,745	0,715	0,44
Méthionine	0,275	0,231	0,226	0,238
Tyrosine	0,064	0,032	0,043	0,11
Iso-leucine	0,50	0,42	0,55	0,33
Leucine	0,31	0,24	0,24	0,20
Phényl-ala.	0,52	0,27	0,125	0,31
Tryptoph.	0,413	0,486	0,425	0,56

ORGE - ETUDE DES MUTANTS VIRIDIS - BASSE TEMPERATURE

Tableau (XXXI) - Teneurs en sucres libres dans les plants d'Orge normaux et mutés cultivés à basse température (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Glucose	1,66	1,127	0,95	1,14
Fructose	1,49	1,05	1,43	1,60
Ribose	0,17	0,117	0,162	0,216

ORGE - ETUDE DE MUTATIONS CHLOROPHYLLIENNES AVANCEES - LUMIERE NORMALE

Tableau (XXXII) - Morphologie des mutants M₄, M₅, M₆, M₇ : tailles (en mm) et poids frais (en mg) - $\epsilon = 7 \pm 10 \%$

	Témoins	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇
Taille de C (mm)	146,5	108,3	110	137,2	106
Taille de F(1) (mm)	187,5	82	92	96,5	107
Poids total (mg)	232	123	130	132,1	161
Nombre de plants	65	10	10	10	10

Tableau (XXXIII) - Equipement pigmentaire des mutants M₄, M₅, M₆, M₇ comparé à celui des plants normaux (nM/mg)

Pigments	Témoins	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇
Chlor. (a)	0,623	0,059	0	0	0,0
Chlor. (b)	0,392	0,027	0	0	0,0
Carotène	0,207	0,041	0,0102	0,028	0,0
Lutéine	0,287	0,106	0,122	0,11	0,0
Viola-X.	0,198	0,0716	0	0	0,0
Néo-Xanth.	0,080	0,025	0,014	0,019	0,0

Tableau (XXXIV) - Teneurs en amino-acides dans les mutants M_4, M_5, M_6, M_7 et les témoins, placés en lumière normale (nM/mg)

Amino-Acides	Témoins	M_4	M_5	M_6	M_7
Ornithine	0,447	0,467	0,595	0,756	0,668
Lysine	0,558	0,705	0,930	0,883	0,85
Histidine	0,604	2,21	1,50	2,23	1,77
Arginine	0,215	0,76	0,43	0,71	0,68
Ac. Aspart.	0,41	1,03	0,984	1,15	0,80
Asparagine	1,23	7,14	5,97	6,53	5,10
Sérine	0,645	1,495	1,16	1,70	1,025
Glycocolle	0,27	0,61	0,76	0,48	0,32
Ac. Glutam.	1,15	1,025	0,83	0,88	0,63
Glutamine	0,43	0,43	0,33	0,44	0,26
Thréonine	0,56	0,74	0,60	0,76	0,683
Alanine	0,76	0,61	0,78	0,83	0,35
Ac. γ Am. But.	1,27	0,36	0,27	0,34	0,16
Proline	0,033	0,017	0,044	0,064	0,080
Ac. α Am. But.	0,153	0,28	0,10	0,17	0,12
Valine	0,357	1,30	0,914	1,127	1,36
Méthionine	0,23	0,910	0,43	0,55	0,74
Tyrosine	0,086	ϵ	0,35	ϵ	ϵ
Iso-leucine	0,24	0,612	0,47	0,50	0,60
Leucine	0,21	0,88	0,48	0,64	0,38
Phényl-ala.	0,21	0,91	0,94	0,93	0,57
Tryptoph.	0,22	0,81	1,01	1,11	1,13

Tableau (XXXV) - Teneurs en sucres libres dans les mutants M_4, M_5, M_6, M_7 et les témoins placés en lumière normale (nM/mg)

Sucres	Témoins	M_4	M_5	M_6	M_7
Saccharose	0,116	0,067	0,27	0,011	0,011
Glucose	2,87	0,97	0,75	1,03	0,876
Fructose	3,01	0,34	0,274	0,26	0,22
Ribose	0,22	0,41	0,71	0,73	0,43

Tableau (XXXVI) - Teneurs pigmentaires dans les plants d'Orge normaux et les mutants M_4, M_5, M_6, M_7 placés en lumière atténuée (nM/mg)

Pigments	Témoins	M_4	M_5	M_6	M_7
Chlor. (a)	0,48	0,034	0,015	0,00	0,032
Chlor. (b)	0,29	0,019	0,012	0,00	0,008
Carotène	0,14	0,018	0,0068	0,00945	0,008
Lutéine	0,217	0,066	0,093	0,096	0,026
Viola-X.	0,15	0,039	0,037	0,00	0,025
Néo-Xanth.	0,067	0,015	0,016	0,0077	0,011

Tableau (XXXVII) - Teneurs en amino-acides libres dans les plants d'Orge normaux et les mutants M_4, M_5, M_6, M_7 placés en lumière atténuée (nM/mg)

Amino-Acides	Témoins	M_4	M_5	M_6	M_7
Ornithine	0,733	0,501	0,91	0,87	0,96
Lysine	0,93	0,67	0,81	0,87	1,41
Histidine	0,82	1,50	1,75	1,51	1,69
Arginine	0,31	0,39	0,47	0,43	0,34
Ac. Aspart.	0,61	0,69	0,92	0,838	0,84
Asparagine	2,28	5,27	5,06	4,62	5,50
Sérine	0,556	1,01	1,53	1,47	1,27
Glycocolle	0,35	0,77	0,61	0,656	0,48
Ac. Glutam.	1,06	1,27	0,98	1,09	1,06
Glutamine	0,387	0,422	0,40	0,53	0,39
Thréonine	0,55	0,44	0,54	0,39	0,62
Alanine	0,53	0,62	0,85	0,56	0,46
Ac. γ Am. But.	0,88	0,29	0,19	0,40	0,17
Proline	0,033	0,045	0,035	0,018	0,00
Ac. α Am. But.	0,25	0,35	0,29	0,28	0,17
Valine	0,59	1,31	1,09	0,96	1,66
Méthionine	0,13	0,81	0,59	0,33	0,96
Tyrosine	8	0,50	0,34	0,32	0,46
Iso-leucine	0,47	0,54	0,38	0,345	0,76
leucine	0,36	0,64	0,54	0,47	0,76
Phényl-ala.	0,26	0,85	0,90	0,74	0,86
Tryptoph.	0,26	0,53	0,62	0,52	1,06

Tableau (XXXVIII) - Teneurs en sucres libres dans les plants d'Orge normaux et les mutants M_4, M_5, M_6, M_7 placés en lumière atténuée (nM/mg)

Sucres	Témoins	M_4	M_5	M_6	M_7
Saccharose	0,150	0,204	0,09	0,11	0,06
Glucose	1,10	1,20	1,26	1,21	0,90
Fructose	0,80	0,46	0,32	0,54	0,34
Ribose	0,35	7,46	0,59	10,5	0,60
	54	34	45,6	4,26	33

ORGE - T/V_1 VERDISSEMENT A TEMPERATURE ELEVEE

Tableau (XXXIX) - Teneurs pigmentaires chez les plants d'Orge normaux et mutés (V_1) replacés à température élevée après étiolement au froid (nM/mg)

Plants	Chl. (a)	Chl. (b)	Carotène	Lutéine	Viola-X.	Néo-Xanth.
Témoins	0,873	0,444	0,245	0,252	0,16	0,0620
V_1	0,897	0,479	0,264	0,268	0,18	0,0626

Tableau (XL) - Teneurs en cofacteurs dans les plants d'Orge normaux et mutés (V_1) après reverdissement à température élevée (nM/mg)¹

Produits	Témoins	Mutants V_1
Toco-chroménol	2,44	1,66
Plasto-chroménol	20,9	20,3
Chroménol-2	1,01	0,7

ORGE - T/V_1 VERDISSEMENT A TEMPERATURE ELEVEE

Tableau (XLI) - Teneurs en amino-acides libres des plants d'Orge normaux et mutés (V_1) après reverdissement à température élevée (nM/mg)

Amino-acides	Témoins	Mut. V_1	Amino-acides	Témoins	Mut.
Ornithine	0,34	0,38	Ac. γ Am. But.	0,45	0,30
Lysine	0,44	0,46	Proline	0,60	0,41
Histidine	0,59	0,63	Ac. α Am. But.	0,14	0,18
Arginine	0,5	0,5	Valine	0,50	0,37
Ac. Aspart.	0,43	0,39	Méthionine	0,15	0,12
Asparagine	4,63	4,10	Tyrosine	0,06	0,07
Sérine	0,37	0,42	Iso-leucine	0,10	0,075
Glycocolle	0,55	0,54	Leucine	0,12	0,10
Ac. Glutam.	0,79	0,73	Phényl-ala.	0,29	0,22
Thréonine	0,33	0,42	Tryptoph.	0,33	0,33
Alanine	1,29	0,97	Total général	14,11	12,65

Tableau (XLII) - Teneurs en sucres libres des plants d'Orge normaux et mutés (V_1) après reverdissement à température élevée (nM/mg)

Plants	Saccharose	Glucose	Fructose	Ribose
Témoins	0,23	5,88	4,77	0,08
Mutants V_1	0,47	5,65	4,27	0,10

Tableau (XLI) - Teneurs pigmentaires des plants d'Orge normaux et mutés au cours du reverdissement après étiolement court (nM/mg)

Pigments	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Chlor. (a)	0,373	0,562	0,438	0,58
Chlor. (b)	0,277	0,502	0,354	0,356
Phéophytines	0,283	0,182	0,236	0,14
Carotène	0,137	0,16	0,12	0,16
Lutéine	0,254	0,315	0,252	0,291
Viola-X.	0,131	0,186	0,136	0,162
Néo-Xanth.	0,075	0,070	0,057	0,067

Tableau (XLIV) - Etude des cofacteurs dans les plants d'Orge normaux et mutés au cours du reverdissement après étiolement court (nM/mg)

Composés	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Plasto-chroménol	1,92	2,61	1,53	2,34
Toco-chroménol	0,91	2,04	2,46	2,97
Chroménol-2	0,41	0,23	0,34	0,24
Chroménol-3	-	-	-	-
p. Q. A.	0,17	0,28	0,16	0,14

ORGE - T/M REVERDISSEMENT APRES ETIOLEMENT OBSCUR

Tableau (XLV) - Teneurs en amino-acides libres au cours du reverdissement des plants d'Orge normaux et mutés après étiolement court (nM/mg)

Amino-acides	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Ornithine	0,36	0,51	0,437	0,56
Lysine	0,43	0,618	0,436	0,56
Histidine	0,826	1,29	0,965	1,186
Ac. Aspart.	0,66	0,69	0,65	0,706
Asparagine	9,55	9,76	11,2	9,95
Sérine	0,75	0,88	0,836	0,81
Glycocolle	0,376	0,393	0,43	0,45
Ac. Glutam.	0,695	0,88	0,64	0,82
Glutamine	0,534	0,731	0,51	0,61
Thréonine	0,58	0,82	0,68	0,65
Alanine	0,65	0,76	0,70	0,58
Ac. γ Am. But.	0,38	0,36	0,22	0,32
Proline	0,075	0,128	0,086	0,064
Ac. α Am. But.	0,075	0,087	0,083	0,058
Valine	0,94	1,08	0,88	0,65
Méthionine	0,19	0,185	0,17	0,165
Tyrosine	0,35	0,25	0,12	0,14
Iso-leucine	0,118	0,172	0,141	0,104
Leucine	0,091	0,145	0,100	0,110
Phényl-ala	0,82	0,353	0,117	0,494
Tryptoph.	0,93	1,237	0,87	1,12

Tableau (XLVI) - Teneurs en sucres libres dans les plants d'Orge normaux et mutés au cours du reverdissement après étiolement court (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Saccharose	0,034	0,14	0,086	0,078
Glucose	1,576	2,74	3,26	3,22
Fructose	2,19	3,41	3,11	3,34
Ribose	0,32	0,77	0,92	1,04
Ribose total ^{cf} %	ε	37	49,5	62
Ribose - P				

ORGE - T/M REVERDISSEMENT APRES ETIOLEMENT OBSCUR

Tableau (XLVII) - Teneurs pigmentaires dans les plants d'Orge normaux et mutés au cours du reverdissement après étiolement prolongé (nM/mg)

Pigments	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Chlor. (a)	0,57	0,668	0,466	0,357
Chlor. (b)	0,275	0,368	0,327	0,290
Phéophytines	0,087	0,153	0,369	0,395
Carotène	0,157	0,186	0,191	0,17
Lutéine	0,286	0,28	0,182	0,183
Viola-X.	0,13	0,19	0,12	0,11
Néo-Xanth.	0,060	0,064	0,058	0,049
Xanthophylle néo-formée	0,0	0,0	0,188	0,196

Tableau (XLVIII) - Teneurs en cofacteurs dans les plants d'Orge normaux et mutés au cours du reverdissement après étiolement prolongé (nM/mg)

Composés	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Tocoph.- chroménol	5,46	4,01	3,4	2,91
Chroménol-2	3,03	2,55	2,6	2,1
Chroménol-3	1,52	2,00	2,22	1,73
Plasto- chroménol	3,35	3,30	4,52	5,40

Tableau (XLIX) - Teneurs en amino-acides libres dans les plants d'Orge normaux et mutés au cours du reverdissement après étiolement prolongé (nM/mg)

Amino Acides	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Ornithine	0,267	0,493	0,413	0,484
Lysine	0,37	0,45	0,46	0,48
Histidine	0,856	0,926	1,13	1,18
Ac. Aspart.	0,643	0,648	0,768	0,927
Asparagine	9,96	10,5	12,4	13,0
Sérine	0,377	0,43	0,50	0,59
Glycocolle	0,40	0,35	0,41	0,24
Ac. Glutam.	0,84	0,92	0,92	1,08
Glutamine	0,617	0,692	0,67	0,73
Thréonine	0,411	0,568	0,533	0,564
Alanine	0,543	0,638	0,50	0,567
Ac. γ Am. But.	0,282	0,288	0,20	0,31
Proline	0,085	0,116	0,071	0,043
Ac. α Am. But.	0,041	0,096	0,044	0,06
Valine	0,255	0,250	0,266	0,264
Méthionine	0,250	0,197	0,152	0,236
Iso-leucine	0,195	0,171	0,128	0,163
Leucine	0,188	0,198	0,161	0,171
Phényl-ala.	0,628	0,654	0,418	0,502
Tryptoph.	0,47	0,632	0,289	0,355

Tableau (L) - Teneurs en sucres libres dans les plants d'Orge normaux et mutés au cours du reverdissement après étiolement prolongé (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Saccharose	0,080	0,14	0,17	0,074
Glucose	3,64	3,42	3,7	2,38
Fructose	3,17	3,49	3,33	2,67
Ribose	0,15	0,21	0,48	0,56

ORGE - TEMOINS/VIRIDIS - INCORPORATION D'ACETATE-1-¹⁴C

Tableau (LI) - Analyse des pigments chez les plants d'Orge témoins et mutés aux temps 5H, 10 H et 15 H après incorporation d'acétate-1-¹⁴C (nM/mg)

Pigments/ 5 H	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Chlor. (a)	1,10	1,08	0,85	1,02
Chlor. (b)	0,67	0,76	0,526	0,695
Phéophytines	0,047	0,24	0,107	0,321
Carotène	0,282	0,314	0,208	0,29
Lutéine	0,38	0,41	0,31	0,356
Viola-X.	0,20	0,22	0,142	0,154
Néo-Xanth.	0,097	0,097	0,069	0,071

Pigments/10 H				
Chlor. (a)	1,10	0,99	0,886	0,945
Chlor. (b)	0,646	0,590	0,494	0,565
Phéophytines	0,096	0,242	0,076	0,243
Carotène	0,299	0,272	0,229	0,27
Lutéine	0,314	0,29	0,26	0,308
Viola-Xanth.	0,171	0,153	0,130	0,164
Néo-Xanth.	0,1186	0,100	0,085	0,09

Pigments/15 H				
Chlor. (a)	1,126	0,902	0,787	0,978
Chlor. (b)	0,636	0,504	0,438	0,605
Phéophytines	0,0637	0,124	0,10	0,0717
Carotène	0,322	0,254	0,231	0,321
Lutéine	0,304	0,25	0,218	0,291
Viola-X.	0,165	0,133	0,119	0,166
Néo-Xanth.	0,073	0,055	0,042	0,070

Tableau (LII) - Analyse des cofacteurs chez les plants d'Orge témoins et mutés aux temps 5 H, 10 H, 15 H après incorporation d'acétate-1-¹⁴C (nM/mg)

Composés/t 5 H	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Plasto-chroménol	0,716	0,59	0,25	0,27
Tocophéryl-chroménol	3,69	2,79	2,34	2,35
Chroménol-2	0,83	0,86	0,84	0,70
Chroménol-3	0,37	0,29	0,15	0,07
pQ. A	0,0133	0,044	0,017	≈ 0,01
Composés/t 10 H				
Plasto-chroménol	0,58	0,45	0,33	0,34
Tocophéryl-chroménol	4,36	4,69	3,67	3,3
Chroménol-2	1,30	1,9	1,35	0,94
Chroménol-3	0,53	1,03	0,74	0,52
pQ. A.	0,018	0,032	0,030	0,021
Composés/t 15 H				
Plasto-chroménol	0,97	0,98	0,75	0,63
Tocophéryl-chroménol	2,96	2,90	2,22	2,26
Chroménol-2	0,93	0,93	0,887	0,84
Chroménol-3	0,44	0,57	0,69	0,78
pQ. A.	0,037	0,052	0,030	0,088

Tableaux(LIHI) - (LIV) - (LV) VOIR PAGE SUIVANTE

Tableau (LVI) - Analyse des sucres dans les plants d'Orge normaux et mutés cultivés sous 3000 lux, après incorporation d'acétate-1-¹⁴C (nM/mg)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Saccharose	0,175	0,236	0,453	0,216
Glucose	42,3	33,3	26,6	23,9
Fructose	9,47	6,9	5,3	5,26

Amino- Acides	Témoins			V ₁			V ₂			V ₃		
	5 H	10 H	15 H	5 H	10 H	15 H	5 H	10 H	15 H	5 H	10 H	15 H
Ornithine	0,99	0,69	0,74	1,33	1,18	1,26	1,25	1,03	0,97	1,85	0,72	1,1
Lysine	0,71	1,19	0,77	0,84	1,24	1,1	0,93	1,21	0,84	1,00	1,19	1,2
Histidine	0,14	0,29	0,12	0,67	1,12	0,44	1,44	0,95	0,47	1,76	0,90	0,57
Arginine	0,10	0,17	0,097	0,22	0,31	0,19	0,23	0,29	0,18	0,36	0,34	0,28
Ac. Aspart.	0,18	0,40	0,115	0,48	0,46	0,37	0,50	0,53	0,27	0,46	0,45	0,41
Asparagine	0,84	2,14	2,16	8,01	6,1	7,04	10,46	5,76	6,25	10,66	4,9	8,95
Sérine	0,21	0,54	0,27	2,32	0,93	1,11	4,53	1,04	1,22	3,26	1,13	1,23
Glycocolle	0,36	0,56	0,57	1,73	0,79	1,13	1,42	1,12	1,01	2,1	0,91	1,06
Ac. Glutam.	0,10	0,48	0,35	0,66	0,86	0,56	0,81	1,3	0,97	0,82	1,86	1,23
Glutamine	0,26	0,63	0,34	0,72	0,97	0,66	0,82	0,92	1,08	0,96	1,13	0,89
Thréonine	0,25	0,84	0,61	0,78	1,13	0,83	1,02	1,17	0,71	0,99	1,22	0,89
Alanine	1,14	0,82	1,00	1,82	1,33	1,48	2,10	1,29	1,02	1,67	1,10	1,21
Ac. β Am. But.	0,27	0,89	0,98	0,73	1,86	1,34	0,65	1,04	0,73	0,64	0,89	0,78
Ac. α Am. But.	0,014	0,02	0,26	0,046	0,11	0,33	0,025	0,15	0,15	0,021	0,28	0,20
Valine	0,18	0,64	0,34	0,79	0,89	0,92	1,03	0,89	0,68	1,28	0,88	0,85
Iso-leucine	0,10	0,15	0,16	0,37	0,61	0,37	0,60	0,31	0,26	0,68	0,37	0,42
Leucine	0,12	0,30	0,23	0,49	0,80	0,38	0,45	0,45	0,34	0,96	0,38	0,32
Phényl-ala.	0,11	0,22	0,22	0,47	0,19	0,10	0,19	0,22	0,06	0,12	0,19	0,04
Tryptophane	0,14	0,35	0,34	0,98	1,75	0,65	0,69	0,74	0,29	1,45	1,04	0,79

Tableaux (LIII) - (LIV) - (LV) - Analyse des amino-acides chez les plants d'Orge témoins et mutés aux temps 5 H, 10 H et 15 H après incorporation d'acétate-¹⁴C (nM/mg)

TRADESCANTIA - CHLOROPLASTES ET CYTOPLASME ISOLES

Tableau (LVII) - Séparation des éléments cellulaires végétaux sur gradient de densités

Densité du milieu	Eléments en suspension
1,55	Débris foliaires et cellulaires, membranes cytoplasmiques
1,50	Membranes cytoplasmiques
1,46	Chloroplastes + Fragments de cellules, membr vaisseaux, poils
1,42	Chloroplastes pratiquement purs. (+ quelques grana)
1,38	Fragments de membranes et grana
1,34	Débris de chloroplastes (grana) et organites cellulaires (mitochondries)

Tableau (LVIII) - Préparation d'un gradient de densités à l'aide du mélange éther de pétrole + Tétrachlorure de carbone

Densités	1,59	1,55	1,50	1,46	1,42	1,38	
Ether de pétrole d = 0,6	0	4,2	10	15,1	20,75	26,9	3
CCl ₄ d. 1,59	100	100	100	100	100	100	10

TRADESCANTIA - CHLOROPLASTES ET CYTOPLASME ISOLES

au (LIX) - Teneurs en amino-acides libres dans les chloroplastes et le cytoplasme de Tradescantia en lumière normale et atténuée : valeurs rapportées respectivement aux poids secs de feuilles et d'éléments séparés (nM/mg)

Amino Acides	Chloroplastes		Cytoplasme		Chloroplastes		Cytoplasme	
	L.N.	L.A.	L.N.	L.A.	L.N.	L.A.	L.N.	L.A.
	nano Moles/g de feuilles sèches				nM/mg chloropl. secs		nM/mg Cytoplasme sec	
Glutamine	17,66	17,30	33,30	52,30	1,98	1,86	0,64	1,04
Asparagine	21,0	26,65	57,1	84,0	2,36	2,87	1,08	1,67
Glutamine	19,1	25,2	39,4	55,8	2,15	2,79	0,74	1,11
Asparagine	23,7	28,4	62,0	93,0	2,66	3,07	1,17	1,84
Aspart.	32,1	39,3	95,2	149,5	3,61	4,23	1,80	2,96
Asparagine	31,1	17,9	103	82,2	3,49	1,93	1,94	1,63
Glutamine	45,6	60,9	121	205	5,13	6,57	2,29	4,07
Glucosyl	41,25	55,5	76,6	169,6	4,65	5,98	1,44	3,36
Glutam.	48,3	39,8	178	178	5,43	4,27	3,36	3,53
α-NH ₂	15,0	13,4	62,5	62,5	1,68	1,44	1,18	1,24
Glutamine	20,35	22,2	79,8	80,2	2,29	2,42	1,51	1,59
Glutamine	27,9	29,6	105,5	111,5	3,14	2,90	2,0	2,21
γ-Am. But.	16,5	15,15	94,8	134,6	1,86	1,63	1,79	2,67
Glutamine	10,85	13,5	30,2	37,4	1,22	1,46	0,57	0,74
Glutamine	18,0	19,0	54,5	71,4	2,02	2,04	1,03	1,42
Thionine	19,5	15,7	18,75	19,7	2,19	1,69	0,355	0,355
Proline	1,97	1,78	3,11	5,46	0,222	0,192	0,059	0,108
β-leucine	8,40	12,50	19,30	27,1	0,94	1,34	0,36	0,54
Glutamine	8,02	10,9	21,6	38,05	0,90	1,175	0,41	0,755
nyl-ala.	5,94	9,50	17,85	28,2	0,666	1,02	0,34	0,56
ptoph.	4,82	7,62	10,74	15,65	0,55	0,82	0,20	0,31

TRADESCANTIA - CHLOROPLASTES ET CYTOPLASME ISOLES

Tableau (LX) - Teneurs en amino-acides libres dans les chloroplastes et le cytoplasme de Tradescantia en lumière normale et atténuée : expression en % par rapport à la quantité totale d'amino-acides

Amino Acides	CHLOROPLASTES		CYTOPLASME	
	L. N.	L. A.	L. N.	L. A.
Ornithine	4,04	3,60	2,60	3,09
Lysine	4,81	5,52	4,45	4,96
Histidine	4,38	5,36	3,35	3,29
Arginine	5,43	5,80	4,82	5,48
Ac. Aspart.	7,35	8,14	7,41	8,82
Asparagine	7,11	3,71	8,00	4,70
Sérine	10,46	12,65	9,40	12,1
Glycocolle	9,45	11,51	5,87	10,0
Ac. Glutam.	11,07	8,23	13,85	10,50
Glutamine	3,43	2,78	4,86	3,69
Thréonine	4,66	4,60	6,22	4,72
Alanine	6,40	6,13	8,2	6,58
Ac. γ Am. But.	3,79	3,14	7,36	7,95
Proline	2,48	2,81	2,35	2,21
Valine	4,12	3,95	4,25	4,22
Méthionine	4,47	3,25	1,46	1,05
Tyrosine	0,44	0,37	0,24	0,32
Iso-leucine	1,92	2,59	1,50	1,60
Leucine	1,83	2,26	1,68	2,25
Phényl-alanine	1,36	1,97	1,39	1,66
Tryptoph.	1,13	1,78	0,84	0,92

Tableau (LXI) - Sens et amplitude des variations de teneurs en amino-acides libres dans les chloroplastes et le cytoplasme de Tradescantia lors du passage de la lumière normale à la lumière atténuée

Amino Acides	Valeurs en nM/mg feuilles sèches		Valeurs en % relatifs	
	Chloroplastes	Cytoplasme	Chloroplastes	Cytoplasme
	%	%	%	%
Ornithine	- 2	+ 57	- 11,2	+ 19
Lysine	+ 27	+ 47	+ 10,5	+ 10,1
Histidine	+ 32	+ 42	+ 22,5	- 2
Arginine	+ 20	+ 50	+ 7	+ 14
Ac. Aspart.	+ 22	+ 57,5	+ 10,1	+ 19
Asparagine	- 74	- 25	- 92	- 70
Sérine	+ 51	+ 69	+ 21	+ 29
Glycocolle	+ 34,5	+ 121	+ 22	+ 70
Ac. Glutam.	- 21,5	0	- 34,5	- 32
Glu.-NH ₂	- 11,2	0	- 23,5	- 32
Thréonine	+ 9,5	+ 0,5 (≈ 0)	- 1,4 (≈ 0)	- 32
Alanine	+ 1,0 (≈ 0)	+ 6,0	- 4,5	- 24,5
Ac. γ Am. But.	- 9	+ 42	- 20,5	+ 8
Proline	+ 25	+ 24	+ 13,4	- 6
Valine	+ 5,5	+ 31	- 4	- 0,8 (≈ 0)
Méthionine	- 24	- 6	- 37,5	- 39
Tyrosine	- 11,5	+ 76	- 19	+ 33,5
Iso-leucine	+ 49	+ 41	+ 35	+ 7
Leucine	+ 36	+ 71	+ 23,6	+ 34
Phényl-Alanine	+ 61	+ 58,5	+ 45	+ 19,5
Tryptoph.	+ 58,5	+ 45,5	+ 57,4	+ 9,5

Tableau (LXII) - Rendements maxima en amino-acides libres obtenus dans les chloroplastes de Tradescantia isolés par voie "humide".

Amino-Acides	Voie sèche nM	Voie humide nM	Rendement par voie humide
Lysine + Histidine	4,11	2,40	58,5 %
Asp. + Arginine	5,70	2,70	47,4
Sérine + Glycocolle	8,88	5,3	59,6
Asparagine	3,18	1,9	59,8
Valine	1,84	0,72	39,1
Méthionine	2,00	0,81	40,5

ORGE - ACTION D'INHIBITEURS METABOLIQUES

Tableau (LXIII) - Teneurs pigmentaires dans les plants d'Orge témoins et traités par NaF et FCH₂COONa (nM/mg)

Plants	Chl. (a)	Chl. (b)	Carotène	Lutéine	Viola-X.	Néo-Xa
Témoins	0,96	0,454	0,196	0,30	0,153	0,07
+ NaF	0,586	0,284	0,128	0,20	0,065	0,04
+ FCH ₂ COONa	0,483	0,187	0,136	0,18	0,125	0,04

Tableau (LXIV) - Teneurs en cofacteurs dans les plants d'Orge témoins et traités par NaF et FCH₂COONa (nM/mg)

Plants	Tocoph-chroménol	Chroménol-2	p.Q.A.	Plasto-chr
Témoins	2,01	0,20	0,17	2,96
+ NaF	1,45	0,27	0,11	2,76
+ FCH ₂ COONa	1,10	Traces	Traces	3,94

ORGE - ACTION D'INHIBITEURS METABOLIQUES

Tableau (LXV) - Teneurs en amino-acides libres dans les plants d'Orge témoins et traités par NaF et FCH₂COONa (nm/mg)

Amino-Acides	Témoins	+ NaF	+ FCH ₂ COONa
Ornithine	1,96	2,37	2,77
Lysine	1,62	1,85	2,14
Histidine	1,33	1,51	1,68
Arginine	0,81	0,87	-
Ac. Aspart.	1,1	1,5	1,37
Asp.-NH ₂	10,7	8,1	10,2
Sérine	1,5	1,2	1,5
Glycocolle	0,6	0,8	0,9
Ac. Glutam.	0,8	1,50	1,47
Glu.-NH ₂	1,26	1,94	1,61
Thréonine	1,21	1,7	1,31
Alanine	2,1	1,02	0,82
Ac. γ Am. But.	1,3	0,65	1,01
Proline	0,13	0,10	0,18
Ac. α Am. But.	+	+	+
Valine	1,58	2,39	2,43
Méthionine	0,221	0,258	0,81
Iso-leucine	1,16	1,80	1,55
Leucine	0,86	1,2	0,79
Phényl-Ala.	0,22	0,42	0,77
Tryptoph.	1,2	0,56	1,11

Tableau (LXVI) - Teneurs en sucres libres dans les plants d'Orge témoins et traités par NaF et FCH₂COONa (nm/mg)

Plants	Maltose	Saccharose	Glucose	Fructose	Ribose
Témoins	0,20	0,15	8,9	3,9	0,32
+ NaF	2,04	0,52	9,2	2,52	0,64
+ FCH ₂ COONa	0,57	1,82	16,4	8,82	0,24

ORGE - ACTION D'INHIBITEURS METABOLIQUES

Tableau (LXVII) - Teneurs pigmentaires chez l'Orge après 2 durées de traitement par l'aza-guanine, la sulfamide, le di-coumarol (nM/mg)

Pigments	Témoins		+ Di Coumarol		+ Sulfamide		+ Aza Guar.	
	14 j	21 j	14 j	21 j	14 j	21 j	14 j	21 j
Chl. (a)	0,845	0,70	0,75	0,60	0,66	0,356	0,864	0,70
Chl. (b)	0,555	0,43	0,48	0,38	0,41	0,134	0,45	0,38
Phéophytine	0,00	0,180	0,163	0,17	0,19	0,183	0,215	0,17
Carotène	0,223	0,190	0,21	0,146	0,18	0,115	0,295	0,146
Lutéine	0,32	0,147	0,255	0,21	0,25	0,081	0,257	0,21
Viola-X.	0,257	0,130	0,167	0,07	0,165	0,147	0,183	0,07
Néo-Xanth.	0,103	0,074	0,057	0,041	0,055	0,027	0,076	0,041
Dérivé polaire du <u>carotène</u>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,101	0,00	0,101

Tableau (LXVIII) - Teneurs en cofacteurs chez l'Orge après 2 durées de traitement par l'aza-guanine, la sulfamide, le di-coumarol (nM/mg)

Composés	Témoins		Di Coumarol		Sulfamide		Aza-Guanine	
	24 j	31 j	24 j	31 j	24 j	31 j	24 j	31 j
Toco-Chroménol	1,1	2,01	1,23	1,71	0,77	2,26	0,47	2,26
Chroménol-2	Tr.	0,16	Tr.	0,15	Tr.	0,67	Tr.	0,67
Plasto-Chroménol	1,9	3,40	1,3	3,52	1,7	3,43	2,02	3,43

ORGE - ACTION D'INHIBITEURS METABOLIQUES

Tableau (LXIX) - Teneurs en amino-acides libres chez l'Orge après 2 durées de traitement par l'aza-guanine, la sulfamidé , le di-coumarol (nM/mg)

Amino Acides	Témoins		+ Di Coumarol		+ Sulfamide		+ Aza-Guanine	
	24 j	31 j	24 j	31 j	24 j	31 j	24 j	31 j
ornithine	0,864	1,19	1,22	1,12	1,45	3,0	1,58	2,3
lysine	0,46	0,43	0,56	0,44	0,74	1,21	0,43	0,84
histidine	0,397	0,38	0,53	0,46	1,04	1,53	1,70	0,94
arginine	0,35	0,30	0,52	0,31	0,39	0,78	/	0,61
Ac. Aspart.	0,29	0,38	0,41	0,39	0,55	0,99	0,79	0,70
asp.-NH ₂	0,27	1,10	1,25	0,37	5,25	10,8	11,25	8,2
serine	0,46	0,29	0,50	0,47	1,51	2,71	0,45	0,54
glycocolle	0,26	0,35	0,36	0,25	+	≈ 0	0,59	0,31
Ac. Glutam.	0,423	0,44	0,455	0,50	0,63	1,40	0,76	1,13
glu.-NH ₂	0,68	0,73	0,67	0,83	0,88	1,30	0,28	1,42
thréonine	0,29	0,17	0,556	0,18	0,75	0,14	0,956	0,54
alanine	0,79	0,50	0,88	0,74	0,84	1,10	1,27	1,10
Ac. γ Am. But.	0,92	0,42	0,675	0,306	0,545	0,246	0,703	0,134
proline	0,11	+	0,13	0,102	0,16	0,172	0,20	0,036
valine	0,415	0,30	0,55	0,42	0,79	2,50	1,67	1,22
méthionine	0,173	0,16	0,306	0,14	0,30	0,34	0,23	0,23
iso-leu.	0,114	0,082	0,118	0,081	0,118	0,50	0,22	0,20
leucine	0,22	0,20	0,15	0,11	0,17	0,36	0,21	0,15
Phényl-Ala.	0,086	0,22	0,115	0,21	0,132	0,13	0,114	0,16
tryptoph.	0,163	0,20	0,155	0,19	0,194	1,31	0,33	0,33

Tableau (LXX) - Teneurs en sucres libres chez l'Orge après 2 durées de traitement par l'aza-guanine, la sulfamide, le di-coumarol (nM/mg)

Sucres	Témoins		+ Di Coumarol		+ Sulfamide		+ Aza Guanine	
	24 j	31 j	24 j	31 j	24 j	31 j	24 j	31 j
Saccharose	0,48	0,24	2,08	3,00	4,2	10,2	11,45	13,8
Glucose	23,7	14,7	40,7	20,5	30,4	33,4	57,2	53
Fructose	11,05	13	16,65	33,45	18	25,0	14,1	22,2
Ribose	0,234	0,084	0,20	53	0,28	0,11	0,28	0,092

ORGE - TEMOINS/MUTANTS - ACTION DU p. C. M. B.

Tableau (LXXI) - Etude des cofacteurs dans les plants d'Orge témoins et mutés : traités au p.C.M.B. et non traités (nM/n.

Produits	Témoins		V ₁		V ₂		V ₃	
	N	pCMB	N	pCMB	N	pCMB	N	p
Tocophéryl- -chroménol	6,5	16,9	5,66	13,8	9,24	12,3	8,05	8,
Chroménol-2	1,42	5,9	1,40	6,5	2,1	5,15	1,9	2,
Chroménol-3	0,38	2,15	0,19	2,26	0,63	1,57	0,61	0,
Plasto- chroménol	0,62	2,07	0,81	2,46	1,91	5,15	0,88	3,
p. Q. A.	0,0956	0,166	0,105	0,258	0,127	0,182	0,128	0,

Tableau (LXXII) - Etude des amino-acides libres dans les plants d'Orge témoins et mutés : traités au p.C.M.B. et non traités (nM/mg)

Amino Acides	Témoins		V ₁		V ₂		V ₃	
	N	pCMB	N	pCMB	N	pCMB	N	pCMB
Ornithine	0,815	1,92	0,872	3,03	1,04	3,65	0,96	3,75
Lysine	0,882	0,883	0,924	1,22	1,077	1,55	1,072	1,54
Histidine	0,844	1,06	0,956	1,40	0,992	1,92	1,040	2,20
Arginine	0,584	0,91	0,955	1,06	0,566	1,23	0,712	1,38
Ac. Aspart.	0,667	0,92	0,886	1,20	0,648	1,30	0,79	1,74
Glyc.-NH ₂	10,3	7,2	10,3	11,8	12,5	18,3	10,7	20,5
Sérine	0,37	0,73	0,55	1,05	0,63	1,23	0,62	1,15
Glycocolle	0,58	0,90	0,74	0,87	1,0	0,93	0,94	0,94
Ac. Glutam.	0,77	0,86	0,976	0,93	0,856	1,27	0,92	1,37
Glutamine	0,82	0,98	1,19	1,16	1,28	1,71	1,126	1,60
Thréonine	1,045	1,37	0,84	1,51	1,045	2,31	0,81	1,38
Alanine	1,35	1,48	1,013	1,25	1,015	1,56	0,707	1,20
Ac. Am. But.	1,60	1,57	1,435	1,10	0,535	0,76	0,315	1,06
Proline	0,024	0,21	0,046	0,10	0,025	0,51	0,039	0,93
Valine	1,144	0,67	0,756	0,74	0,72	1,25	0,531	0,96
Méthionine	0,194	0,32	0,172	0,29	0,128	0,17	0,116	0,24
Iso-leu.	0,567	0,244	0,26	0,393	0,33	0,444	0,22	0,233
Leucine	0,20	0,272	0,16	0,34	0,18	0,425	0,14	0,443
Phényl-ala.	0,090	0,322	0,115	0,311	0,091	0,443	0,058	0,480
Tryptoph.	1,123	0,75	0,863	0,981	0,846	1,28	0,746	1,285

Tableau (LXXIII) - Etude des sucres libres dans les plants d'Orge témoins et mutés : traités au p.C.M.B. et non traités (nM/mg)

Sucres	Témoins		V ₁		V ₂		V ₃	
	N	pCMB	N	pCMB	N	pCMB	N	pCMB
Saccharose	0,353	1,79	0,371	0,34	0,328	1,85	0,540	2,95
Glucose	5,85	11,40	5,41	5,98	4,81	14,1	4,11	14,46
Fructose	4,22	7,0	3,48	4,87	3,63	8,4	3,73	8,0
Ribose	0,23	0,257	0,32	0,226	0,236	3,70	0,254	0,323

ACTION DE LA LEUCINE SUR L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE DE L'ORGE

Tableau (LXXIV) - Morphologie des plants d'Orge témoins et traités par la leucine (N=4)

DOSES	0	2 μ M/ml	4 μ M/ml	8 μ M/ml	16 μ M/ml	24 μ M/ml
C (mm)	218	220,5	203	190,5	195	183
C (mg)	123	140	137	138,5	153,5	122
F(1) (mm)	281	320	313	205	170	185
F(1) (mg)	77	100,4	125	84	78	62

Tableau (LXXV) - Variations des teneurs en cofacteurs chez l'Orge sous l'effet de doses croissantes de L-leucine (nM/mg)

Composés nM/mg	Doses de leucine μ M/ml					
	0	2	4	8	16	24
Tocophéryl chroménol	2,77	3,14	3,68	3,93	6,49	7,0
chroménol-2	0,63	0,62	0,75	1,365	1,40	1,9
chroménol-3	+	+	+	+	0,43	0,3
Plasto- chroménol	1,22	1,5	1,77	2,29	3,70	4,4
p.Q.A.	0,029	0,043	0,127	0,0515	0,112	0,0

ACTION DE LA LEUCINE SUR L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE DE L'ORGE

Tableau (LXXVI) - Variations des teneurs en amino-acides chez l'Orge sous l'effet de doses croissantes de L-leucine (nM/mg)

amino acides nM/mg	Doses de leucine μ M/ml					
	0	2	4	8	16	24
Glutamine	0,583	0,822	1,024	1,10	2,13	1,83
Asparagine	0,567	0,719	0,985	0,83	1,45	1,27
Glutidine	0,302	0,555	0,726	0,64	1,29	1,25
Alanine	0,188	0,275	0,382	0,76	1,53	1,32
Aspart	0,364	0,517	0,531	0,60	1,546	1,135
...-NH ₂	4,46	6,18	6,63	8,86	18,73	19,51
Valine	0,29	0,547	1,11	0,47	0,38	0,72
Proline	0,61	0,94	1,15	0,98	0,51	0,55
Glutam	0,875	0,318	0,406	0,59	0,63	0,65
...-NH ₂	0,575	0,901	2,02	1,36	2,02	2,94
Sérionine	0,177	0,421	0,99	1,24	0,895	0,682
Alanine	0,784	1,745	2,675	3,28	1,59	1,33
AmBut	0,245	0,464	0,82	0,78	0,311	0,376
Valine	0,068	0,093	0,109	0,072	0,12	0,072
Alanine	0,608	0,601	0,80	0,941	1,61	1,96
Thionine	0,248	0,277	0,38	0,36	1,67	0,99
Pro-leu.	0,188	0,22	0,36	0,21	/	/
Leucine	0,37	1,025	4,57	12,98	18,0	18,55
...-ala	0,114	0,130	0,130	0,307	0,34	0,29
Tryptoph.	0,535	0,615	0,555	0,28	0,23	0,225

Tableau (LXXVIII) - Variations des teneurs en sucres libres chez l'Orge sous l'effet de doses croissantes de L-leucine (nM/mg)

Sucres	Doses de leucine administrée (μ M/ml)					
	0	2	4	8	16	24
Saccharose	0,71	0,563	0,50	0,997	6,63	10,24
Maltose	18,0	16,2	15,40	31,0	36,63	38,79
Lactose	9,4	10,0	8,93	12,6	15,26	15,48
Mannose	0,53	0,65	0,53	0,62	0,79	0,43

INHIBITION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE PAR LA LEUCINE
CHEZ L'ORGE

Tableau (LXXIX) - Variations des teneurs pigmentaires dans les plants d'Orge normaux et mutés, après action de la leucine ($10 \mu\text{M}/\text{cm}^3$) et de l'aza-leucine ($6 \mu\text{M}/\text{cm}^3$) (nM/mg)

Pigments nM/mg	Témoins			V_1			V_2			V_3	
	N	leu	Aza	N	leu	Aza	N	leu	Aza	N	leu
Chl.(a)	0,97	0,52	0,49	0,81	0,74	0,54	0,69	0,64	0,485	0,88	0,76
Chl.(b)	0,527	0,275	0,275	0,38	0,36	0,32	0,28	0,30	0,278	0,38	0,38
Carot.	0,17	0,0785	0,081	0,13	0,0786	0,100	0,078	0,078	0,0996	0,143	0,12
Lutéine	0,346	0,20	0,183	0,256	0,23	0,187	0,178	0,211	0,161	0,27	0,26
Viola- Xanth.	0,202	0,111	0,14	0,13	0,13	0,091	0,088	0,128	0,071	0,127	0,16
Néo- Xanth.	0,080	0,044	0,044	0,052	0,0576	0,0378	0,053	0,050	0,0345	0,057	0,04

Tableau (LXXX) - Variations des teneurs en cofacteurs dans les plants d'Orge normaux et mutés, après action de la leucine ($10 \mu\text{M}/\text{cm}^3$) et de l'aza-leucine ($6 \mu\text{M}/\text{cm}^3$) (nM/mg)

Composés	Témoins			V_1			V_2			V_3	
	N	leu	Aza	N	leu	Aza	N	leu	Aza	N	leu
Tocophéryl chroménol	6,25	4,11	5,27	5,5	4,97	5,4	4,3	3,47	5,5	3,5	3,80
Chromén. 2	0,876	0,66	0,66	0,866	0,83	0,63	1,4	0,83	0,49	0,66	0,94
Chromén. 3	0,38	/	0,20	0,50	/	0,17	0,96	/	0,20	0,18	/
p.Q.A.	+	0,090	/	+	0,094	/	+	0,144	/	+	0,107
Plasto- chroménol	2,66	3,0	2,1	3,8	2,95	2,7	4,8	3,2	6,2	4,0	4,4

INHIBITION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE PAR LA LEUCINE CHEZ L'ORGE

Tableau (LXXXI) - Variations de teneurs en amino-acides libres dans les plants d'Orge normaux et mutés, après action de la leucine ($10 \mu\text{M}/\text{cm}^3$) et de l'aza-leucine ($6 \mu\text{M}/\text{cm}^3$) (nM/mg)

Amino Acides	Témoins			V ₁			V ₂			V ₃		
	N	leu	Aza	N	leu	Aza	N	leu	Aza	N	leu	Aza
Lysine	0,65	0,78	1,89	1,86	0,89	1,70	1,68	0,79	1,52	1,75	0,76	2,35
Arginine	0,43	1,09	1,80	1,11	0,95	1,84	1,43	1,02	0,71	1,15	1,07	1,85
Histidine	0,37	0,96	1,24	1,03	1,12	1,75	1,55	1,02	2,36	1,03	1,37	2,87
Guanine	0,41	0,38	0,47	0,36	0,58	0,42	0,32	0,67	0,50	0,32	0,54	0,59
Aspart.	0,70	0,55	0,44	0,94	0,81	0,45	0,61	0,86	0,74	0,64	0,94	0,80
Pro.-NH ₂	5,0	11,1	7,8	12,6	11,6	8,2	5,7	7,5	11,5	12,6	12,3	10
Valine	0,25	1,36	0,77	1,12	1,95	0,80	1,81	2,36	1,4	1,60	2,34	1,17
Cycocolle	0,43	0,59	0,53	0,83	0,97	0,66	0,90	1,22	0,81	1,17	0,99	0,60
Glutam.	0,211	0,53	0,397	0,44	0,47	0,40	0,96	0,63	0,88	1,02	1,01	0,73
Leu-NH ₂	0,38	1,32	1,1	0,84	1,82	1,1	1,1	1,61	1,33	0,86	1,16	1,46
Oréonine	0,39	0,67	0,53	0,73	1,41	0,63	1,4	1,22	0,50	1,13	1,28	0,72
Alanine	1,58	1,97	0,73	1,27	2,27	0,65	2,5	2,80	1,0	1,0	2,44	0,80
Am. But.	0,87	1,38	0,45	0,90	2,02	0,36	1,2	2,37	0,93	1,13	1,46	0,75
Glycine	0,072	0,134	0,13	0,10	0,21	0,11	0,08	0,25	0,25	0,056	0,077	0,18
Am. But.	+	0,21	0,085	+	0,29	0,075	+	0,30	0,12	+	0,29	0,08
Valine	0,52	1,31	1,2	1,38	1,61	1,10	1,92	1,32	1,13	1,12	1,42	1,48
Méthionine	0,50	+	0,48	0,53	+	0,45	0,45	+	0,40	0,42	+	0,33
Isoleucine	0,09	0,71	0,45	0,37	0,55	0,63	0,58	0,21	0,37	0,40	0,27	0,48
Leucine	0,237	8,4	0,29	0,37	12,5	0,35	0,38	9,2	0,17	0,30	4,5	0,20
Phényl-ala	0,10	0,23	0,22	0,20	0,18	0,09	0,11	0,04	0,11	0,10	0,20	0,24
Tryptoph.	0,03		0,83	0,37		1,78	0,70		0,84	0,34		1,54
Aza-leucine	-		6,1	-		5,6	-		5,6	-		6,7

Tableau (LXXXII) - Variations de teneurs en sucres libres dans les plants d'Orge normaux et mutés, après action de la leucine ($10 \mu\text{M}/\text{cm}^3$) et de l'aza-leucine ($6 \mu\text{M}/\text{cm}^3$) (nM/mg)

	Témoins			V_1			V_2			V_3	
	N	leu	Aza	N	leu	Aza	N	leu	Aza	N	leu
Saccharose	0,268	0,537	0,52	0,417	0,41	0,45	0,29	0,26	1,38	0,65	0,25
Glucose	4,85	14,7	11	8,7	8,7	7,1	5,0	5,44	10,76	3,75	4,86
Fructose	4,57	8,32	8,93	6,3	7,00	6,71	4,2	5,0	8,02	3,94	4,76
Ribose	0,49	0,32	0,33	0,45	0,28	0,35	0,317	0,29	0,22	0,39	0,29

INHIBITION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE PAR LA LEUCINE CHEZ L'ORGE

Tableau (LXXXIII) - Activité spécifique des amino-acides libres après incorporation de leucine (U)-¹⁴C (dose toxique) dans les plants d'Orge normaux et mutés ($\times 10^{-15}$ Ci/nM)

Amino-Acides	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
Ornithine	4,70	4,55	3,84	9,74
Lysine	6,5	7,38	7,45	11,9
Histidine	3,7	3,98	2,50	4,96
Arginine	5,2	+	3,16	+
Ac. Aspart.	11,37	9,45	7,2	15,2
Asparagine	1,61	2,57	3,62	3,40
Sérine	3,96	2,57	++	++
Glycocolle	5,1	3,7	2,8	3,6
Ac. Glutam.	9,2	10,7	15,7	20,4
Glutamine	9,2	7,2	7,4	14,6
Thréonine	4,6	4,8	7,3	8,4
Alanine	15,9	12,3	9,8	16,1
Ac. γ Am. But.	11,66	7,00	17,1	++
Valine	3,85	1,58	6,06	5,21
Iso-leucine	9,52	+++	37,6	12,6
Leucine	16,9	20,3	24,7	20,8
Phényl-Alanine	0	3,9	18,1	8,8

Tableau (LXXXIV) - Activité spécifique des sucres libres après incorporation de leucine (U)-¹⁴C (dose toxique) dans les plants d'Orge normaux et mutés ($\times 10^{-15}$ Ci/nM)

Sucres	Témoins	V ₁	V ₂	V ₃
glucose	7,67	15,1	23,3	30,2
fructose	10,93	14,57	21,7	30,5

Tableau (LXXXV) - Analyse des cofacteurs après action inhibitrice de la leucine et l'aza-leucine sur l'appareil photosynthétique d'Arabidopsis (nM/mg)

Composés	Témoins	+ Leucine	Act.Sp./Leu ¹⁴ C ($\times 10^{-15}$ Ci / nM)	+ Aza-leu
Toco-Chroménol	2,45	4,84	16	3,17
Chroménol-2	1,55	3,85	7,42	2,83
Plastochromé- nol	1,38	1,27	0	1,62

Tableau (LXXXVI) - Variations de teneurs en amino-acides libres après action inhibitrice de la leucine et l'aza-leucine sur l'appareil photosynthétique d'Arabidopsis (nM/mg)

Amino-Acides	Normaux	+ Leucine	Act.Sp./Leu ¹⁴ C ($\times 10^{-15}$ Ci / nM)	Aza leucine
Ornithine	0,09	0,132	70,3	0,38
Lysine	0,108	0,092	100,4	0,196
Histidine	0,064	0,079	74,7	0,060
Arginine	0,155	0,267	77,6	0,272
Ac. Aspart.	0,283	0,355	77,8	0,52
Asparagine	0,71	0,95	65,8	1,8
Sérine	0,62	1,03	+	2,2
Glycocolle	0,53	0,79	9,00	1,0
Ac. Glutam.	1,76	1,81	76,9	1,84
Thréonine	0,21	0,43	5,35	0,65
Alanine	0,40	0,52	-	0,39
Ac. γ Am. But.	0,34	0,32	-	0,45
Proline	0,095	0,114	-	0,143
Valine	0,015	0,0026	-	0,464
Méthionine	0,0202	-	-	0,081
Iso-leucine	0,012	0,041	-	0,108
Leucine	0,037	4,68	2134	0,046
Phényl-Ala.	+	+	-	0,18
Tryptoph.	0,052	0,056	-	0,063
Glutamine	0,86	1,76	44,4	2,94
Aza-leucine	0	0	-	2,41

INHIBITION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE PAR LA LEUCINE CHEZ ARABIDOPSIS

bleau (LXXXVII) - Variations de teneurs en sucres libres après action inhibitrice de la leucine et l'aza-leucine sur l'appareil photosynthétique d'Arabidopsis (nM/mg)
Incorporation de leucine (U)-¹⁴C : Activités spécifiques x 10⁻¹⁵ Ci/nM

Sucres	Témoins	+ leucine	Act.sp. x 10 ⁻¹⁵ Ci/nM (leu ¹⁴ C)	Aza-leucine
Maltose	0,032	0,238		1,80
glucose	0,278	0,48	39,1	0,32
fructose	0,301	0,83	13,86	0,66

STIMULATION DU VERDISSEMENT PAR LA LEUCINE CHEZ L'ORGE

bleau (LXXXVIII) - Variations des teneurs en cofacteurs sous l'action de la leucine à dose faible chez l'Orge (nM/mg)

Produits (nM/mg)	Témoins		V ₁		V ₂		V ₃	
	N	Leu	N	Leu	N	Leu	N	Leu
Toco- Chroménol	4,04	8,38	5,2	7,87	3,5	8,36	4,17	8,56
Chroménol- 2	1,44	3,48	2,02	2,96	1,28	3,1	1,72	3,41
Chroménol- 3	0,4	0,71	0,54	0,58	1,48	0,62	0,29	0,53
pQ. A	0,108	0,130	0,125	0,213	0,175	0,308	0,19	0,175
Plasto- chroménol	1,88	5,7	2,5	5,3	2,97	6,7	3,0	4,14

Tableau (LXXXIX) - Variations des teneurs en amino-acides libres sous l'action de la leucine à dose faible chez l'Orge (nM/mg)

Amino-Acides	Témoins		V ₁		V ₂		V ₃	
	N	Leu.	N	Leu.	N	Leu.	N	Leu.
Ornithine	0,872	1,18	0,98	1,72	0,89	1,28	1,43	1,72
Lysine	0,49	0,512	0,76	0,624	0,54	0,561	0,73	0,624
Histidine	0,37	0,712	0,72	0,910	0,46	0,79	0,83	0,910
Arginine	0,15	0,193	0,257	0,733	0,205	0,36	0,292	0,733
Ac. Aspart.	0,24	0,58	0,425	0,96	0,285	0,60	0,466	0,96
Asp.-NH ₂	4,06	15,86	5,8	9,31	5,22	11,38	12,1	8,62
Sérine	0,62	0,66	0,91	0,51	1,11	0,90	1,40	0,51
Glycocolle	0,40	0,96	0,49	1,32	0,34	1,58	0,345	1,32
Ac. Glutam.	0,67	0,44	0,82	0,74	0,825	0,81	0,70	0,74
Glu.-NH ₂	0,953	1,52	1,32	1,43	1,42	1,91	1,78	2,14
Thréonine	0,50	1,12	0,87	1,11	0,64	1,32	1,15	1,11
Alanine	1,15	2,02	1,38	1,96	0,55	1,99	1,32	1,96
Ac. γ Am. But.	1,23	1,81	1,62	0,90	1,65	1,49	2,2	0,90
Proline	0,0686	0,079	0,148	0,115	0,140	0,047	0,075	0,115
Ac. α Am. But.	0	2,14	0	0,051	0	+	0	0,051
Valine	1,18	2,86	1,29	1,08	0,92	0,73	1,22	0,73
Iso leucine	0,40	0,496	0,527	-	0,154	0,42	0,535	-
Leucine	0,334	2,84	0,378	15,7	0,153	10,35	0,34	13,7
Phényl-Ala.	0,157	0,30	0,130	0,22	0,094	0,29	0,107	0,22
Tryptophane	0,567	0,93	0,68	0,30	0,41	0,46	0,975	0,30

Tableau (XC) - Variations des teneurs en sucres libres sous l'action de la leucine à dose faible chez l'Orge (nM/mg)

Sucres	Témoins		V ₁		V ₂		V ₃	
	N	Leu.	N	Leu.	N	Leu.	N	Leu.
Saccharose	0,66	0,89	0,39	0,866	0,34	0,84	0,53	0,84
Glucose	34	30,7	21,6	29,1	18,1	17,05	17	17,05
Fructose	10,5	10,6	8,9	13,8	7,74	8,35	8,3	10,6
Ribose	0,42	0,54	0,35	0,516	0,24	0,308	0,31	0,516

STIMULATION DU VERDISSEMENT PAR LA LEUCINE CHEZ ARABIDOPSIS

Tableau (XCI) - Activités spécifiques des pigments d'Arabidopsis après incorporation de leucine (U)-¹⁴C à dose faible ($\times 10^{-15}$ Ci/nM)

Pigments	Témoins + Leu ¹⁴ C/5 ^H	Mutants + Leu ¹⁴ C/5 ^H	Mutants + Leu ¹⁴ C/6j
Chlorophylle (a)	42,9	76,6	242
Chlorophylle (b)	10,3	17,42	205
Carotène	168,6	93,4	156,6
Lutéine	16	41,7	137
Violaxanthine	79	36,4	156

Tableau (XCII) - Activités spécifiques des cofacteurs d'Arabidopsis après incorporation de leucine (U)-¹⁴C à dose faible ($\times 10^{-15}$ Ci/nM)

Composés	Témoins+Leu ¹⁴ C 5 ^H de contact	Mutants + 5 ^H de contact	Leu- ¹⁴ C 6 jours
Tocophéryl-Chroménol	20,8	5,8	1,71
Chroménol-2	9,7	10	1,0
Chroménol-3	11,5	6,4	2,2
Plasto-chroménol	0	0	3,62
p. Q. A. ($\times 10^{-15}$ Ci/mg Poids frais)	8,9	5,6	11,3 (Act. Sp. = 21,3 10^{-15} Ci/nM) -

Tableau (XCIII) - Variations de teneurs en amino-acides libres sous l'action de la leucine à dose faible, associée à l'iso-leucine dans les rosettes de feuilles d'Arabidopsis normales et mutées (nM/mg)

Amino-Acides	Témoins	T. + Leu.	Mutants	Mutants + Leucine	
	nM/mg	nM/mg	nM/mg	(5^H de leu- ^{14}C) Teneurs (nM/mg)	Acti. Spéc. x10 ⁻¹
Ornithine	0,227	0,383	0,227	0,406	6
Lysine	0,10	0,16	0,085	0,143	22
Histidine	0,069	0,12	0,020	0,16	12
Arginine	0,063	0,943	0,13	0,72	6
Ac. Aspart.	0,28	0,82	0,35	0,65	5
Asp. NH ₂	0,35	4,03	0,85	3,03	5
Sérine	0,40	0,65	0,50	1,10	5
Glycocolle	0,29	0,87	0,26	0,94	8
Ac. Glutam.	0,93	1,35	1,28	1,20	15
Glu-NH ₂	0,85	1,87	1,10	2,16	10
Thréonine	0,42	0,56	0,61	1,01	2
Alanine	0,70	0,82	0,95	1,16	3
Ac. γ Am. But.	0,19	0,30	0,29	0,32	
Proline	0,15	0,10	0,042	0,072	
Ac. α Am. But.	0,015	0,036	0,11	0,073	31
Valine	0,104	0,160	0,08	0,24	12
Iso-Leucine	0,048	0,050	0,058	5,27	
Leucine	0,060	0,088	0,059	3,30	4
Phényl-Ala.	0,060	0,043	0,046	0,032	27
Tryptophane	0,021	0,0060	0,0065	0,0078	326

Tableau (XCIV) - Variations de teneurs en sucres libres sous l'action de la leucine à dose faible associée à l'iso-leucine, dans les rosettes de feuilles d'Arabidopsis normales et mutées (nM/mg)

Sucres	Témoins nM/mg	T. + Leu. nM/mg	Mutants nM/mg	Mutants + Leu.	
				teneurs nM/mg	Act. x10 ⁻¹⁵
Lactose	0,96	0,98	0,70	1,08	/
Maltose	0,44	0,58	0,55	1,5	55
Glucose	4,27	5,05	3,16	4,3	40
Fructose	2,33	2,27	1,72	2,11	50

EFFETS DE LA LEUCINE SUR L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE DE L'ORGE

Tableau (XCV) - Influence de la concentration en leucine dans le milieu nutritif sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge in vivo

[Leucine] x 10 ⁻³ M ..	0	4	10	30	80
Vitesse initiale x 10 ⁻³ Moles /L./H.	1,30	1,65	1,83	0,82	1,6

Tableau (XCVI) - Influence de la concentration en leucine sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge in vitro

[Leucine] x 10 ⁻³ M -	N=8	N=8	N=7	N=4	N=5	N=6	N=4
	0	0,1	0,2	1,0	2,5	5	10
Vi x 10 ⁻³ Moles/l/H.	1,4 ± 0,16	2,2 ± 0,17	2,0 ± 0,23	1,66 ± 0,27	0,978 ± 0,10	0,935 ± 0,11	0,595 ± 0,10
log ([leu]x 100)	-	1	1,3	2	2,4	2,7	3

Tableau (XCVII) -Inhibition in vitro de l'activité phosphatasique alcaline par la leucine après activation préalable par elle-même in vivo

Conditions [substrat] = 1,88.10 ⁻³ M	[Leu] = 0	[leu] in vivo = 8,3.10 ⁻³ M	
		[Leu] in vitro = 0	[Leu] in vitro = 2,5 M
Vi x 10 ⁻³ Moles/l/H.	0,39	0,51	0,17

EFFETS DE LA LEUCINE SUR L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE DE L'ORGE

Tableau (XCVIII)- Action de la leucine et de l'aza-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge : témoins et mutants viridis

Extraits	N	V_M ($\times 10^{-3}$ Moles/MpNP)	K_m ($\times 10^{-3}$ M : pNPP)	Pente	ρ
Témoins	3	3,37 $\pm$ 0,19	12,02 $\pm$ 1,06	3,56	0,9
T. + Leucine	4	3,97 $\pm$	12,08 $\pm$ 2,98	3,02	0,9
T. + Aza Leucine	3	2,29 $\pm$	9,96 $\pm$ 0,28	4,35	0,9
Mutants V_1	3	3,23 $\pm$ 0,22	11,6 $\pm$ 1,06	3,59	0,9
V_1 + Leucine	5	4,00 $\pm$ 0,48	17,3 $\pm$ 3,66	4,33	0,8
V_1 + Aza Leucine	4	1,59 $\pm$ 0,24	9,9 $\pm$ 1,75	6,23	0,9
Mutants V_2	3	4,27 $\pm$ 0,45	16,93 $\pm$ 3,6	3,97	0,9
V_2 + Leucine	4	1,93 $\pm$ 0,13	10,24 $\pm$ 0,82	5,3	0,9
V_2 + Aza Leucine	4	3,08 $\pm$ 0,33	7,86 $\pm$ 1,62	2,56	0,9
Mutants V_3	6	2,61 $\pm$ 0,14	10,0 $\pm$ 3,6	3,84	0,9
V_3 + Leucine	5	3,67 $\pm$ 0,60	13,15 $\pm$ 3,45	3,59	0,9
V_3 + Aza Leucine	3	4,25 $\pm$ 0,69	11,94 $\pm$ 3,5	2,81	0,9

EFFETS DE LA LEUCINE SUR L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ALCALINE
DE L'ORGE

Tableau (XCIX) - Variations de teneurs en pigments et cofacteurs correspondant aux modifications des cinétiques d'activité phosphatasique induites par la leucine et l'azaleucine dans les plants d'Orge normaux et mutés (Viridis) (nM/mg)

E N T S	Témoins			V ₁			V ₂			V ₃		
	N	Leu	Aza	N	Leu	Aza	N	Leu	Aza	N	Leu	Aza
clo- ph. a)	0,93	0,90	0,655	0,774	0,667	0,731	0,71	0,77	0,62	0,92	0,98	0,76
clo- ph. b)	0,46	0,423	0,30	0,45	0,356	0,41	0,28	0,33	0,27	0,51	0,57	0,38
cro- ne	0,120	0,122	0,071	0,746	0,08	0,078	0,081	0,082	0,073	0,0676	0,098	0,074
- ine	0,275	0,264	0,196	0,24	0,24	0,22	0,187	0,225	0,194	0,30	0,38	0,26
ola- n- ine	0,136	0,131	0,1165	0,135	0,16	0,15	0,087	0,124	0,105	0,19	0,24	0,13
co- anth.	0,078	0,078	0,057	0,070	0,066	0,066	0,054	0,077	0,071	0,081	0,095	0,056
oco- méryl pro- anol	1,5	1,28	1,68	1,34	1,50	1,22	1,1	0,85	1,66	2,34	1,86	2,0
ge es plants	13 j	13 j	13 j	12 j	12 j	12 j	10 j	10 j	10 j	11 j	11 j	11 j
urée du raï- ement	8 j	8 j	8 j	7 j	7 j	7 j	5 j	5 j	5 j	6 j	6 j	6 j

EFFETS DE LA LEUCINE SUR L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ALCALINE
DE L'ORGE

Tableau (C) - Effets de divers autres amino-acides sur l'activité phosphatasique de l'Orge. (Essais préliminaires) - Courbe complète établie pour la Phényl-alanine
Expression des résultats en % de l'activité du témoin

[AA] × 10 ⁻³ M.	0	0,1	2,5	[AA] × 10 ⁻³ M.	0	2,5
Leucine	100 %	157 %	70 %	Ac. Glutam.	100 %	65 %
Phényl-ala.	100	99,8	51	Iso-leucine	100	65
Lysine	100	51	60	Valine	100	76
Tryptophane	100	50	48	Thréonine	100	77
Asparagine	100	80	70	Glycocolle	100	80
Ac. Aspart.	100	72	75	Sérine	100	100
—				Alanine	100	100

[AA] × 10 ⁻³ M.	0	0,1	0,2	1,0	2,5	5
Leucine	100 %	157 %	142 %	120 %	70 %	66 %
Phé-Ala.	100 %	99,8 %	86 %	56 %	51 %	50 %

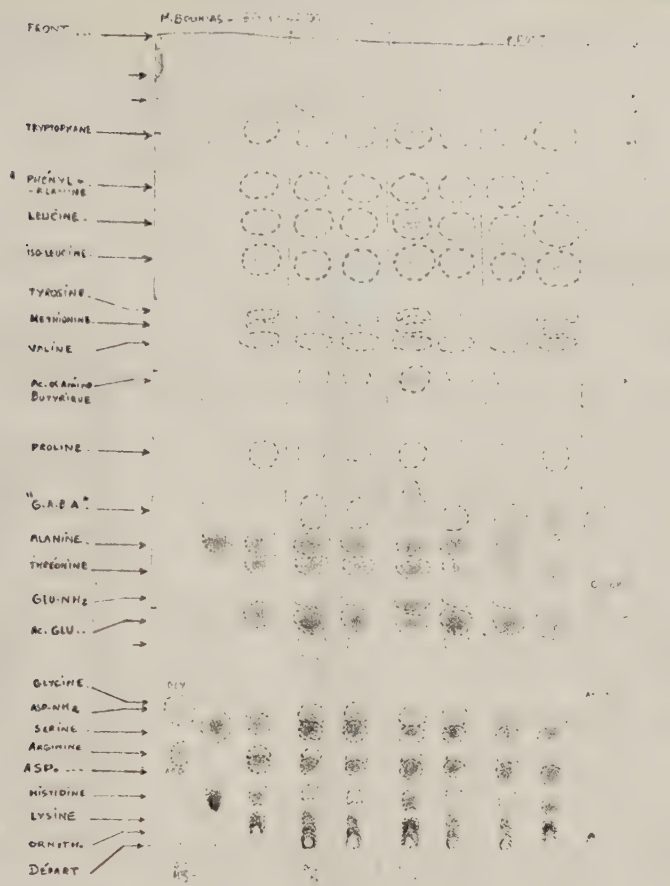


Fig. (I) - Chromatographie des amino-acides isolés à partir d'ex-
traits chloroplastiques et cytoplasmiques chez Tradescantia.

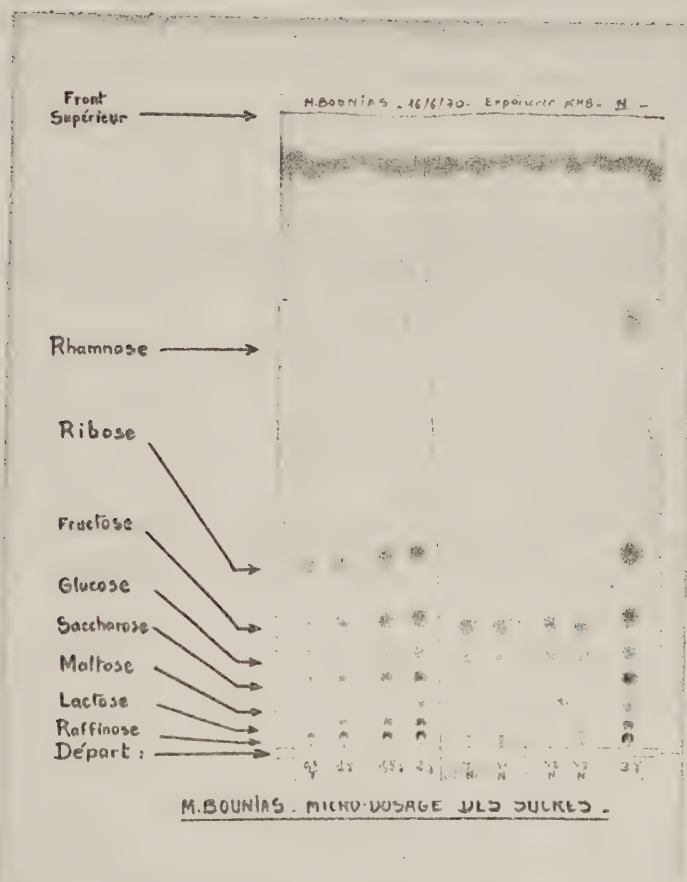


Fig. (II) - Chromatographie des sucres à partir d'extraits d'Orge
témoins et Viridis

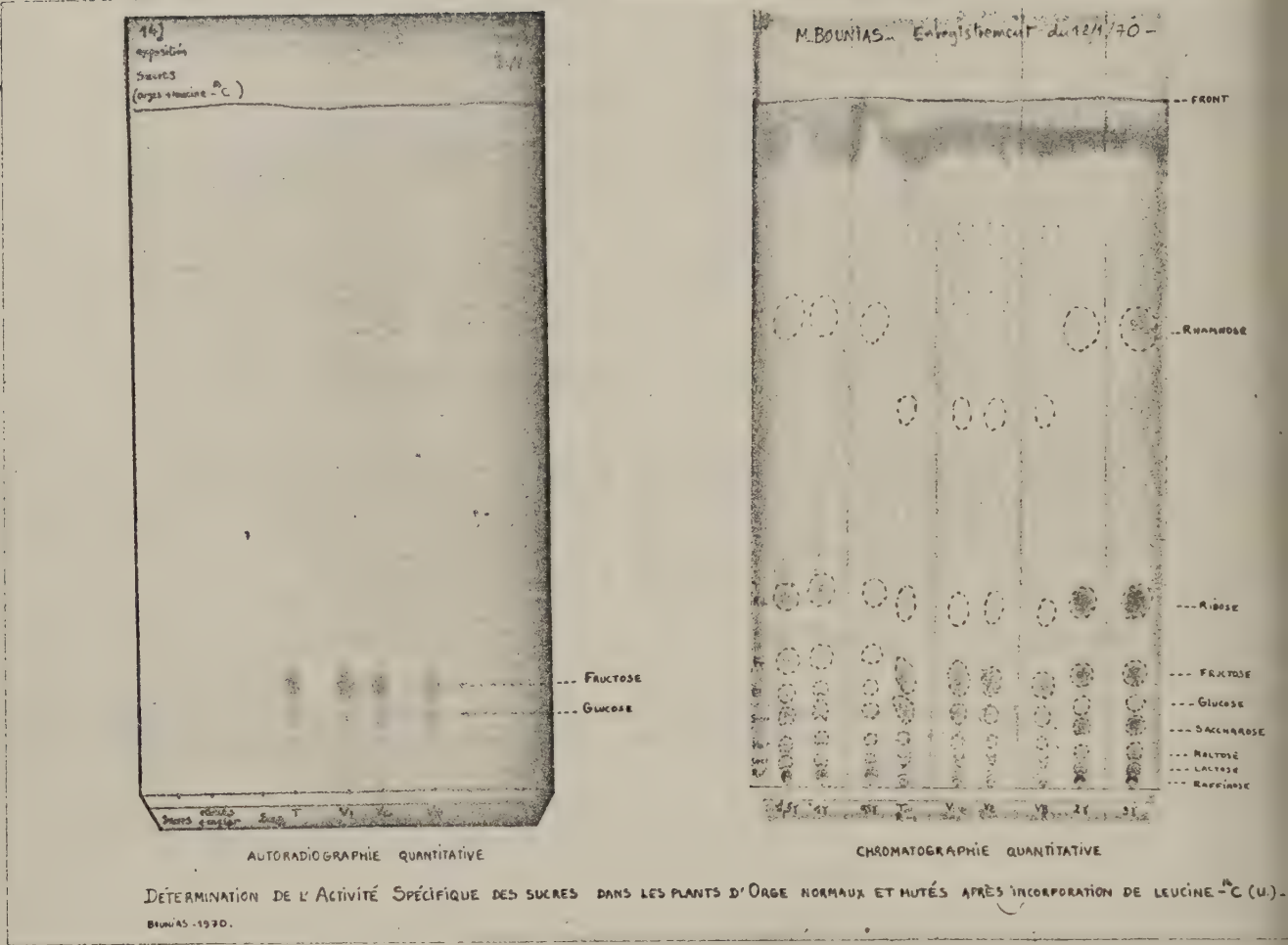


Fig. (III) - Chromatographie de sucres et autoradiographie correspondante chez l'Orge témoins et Viridis

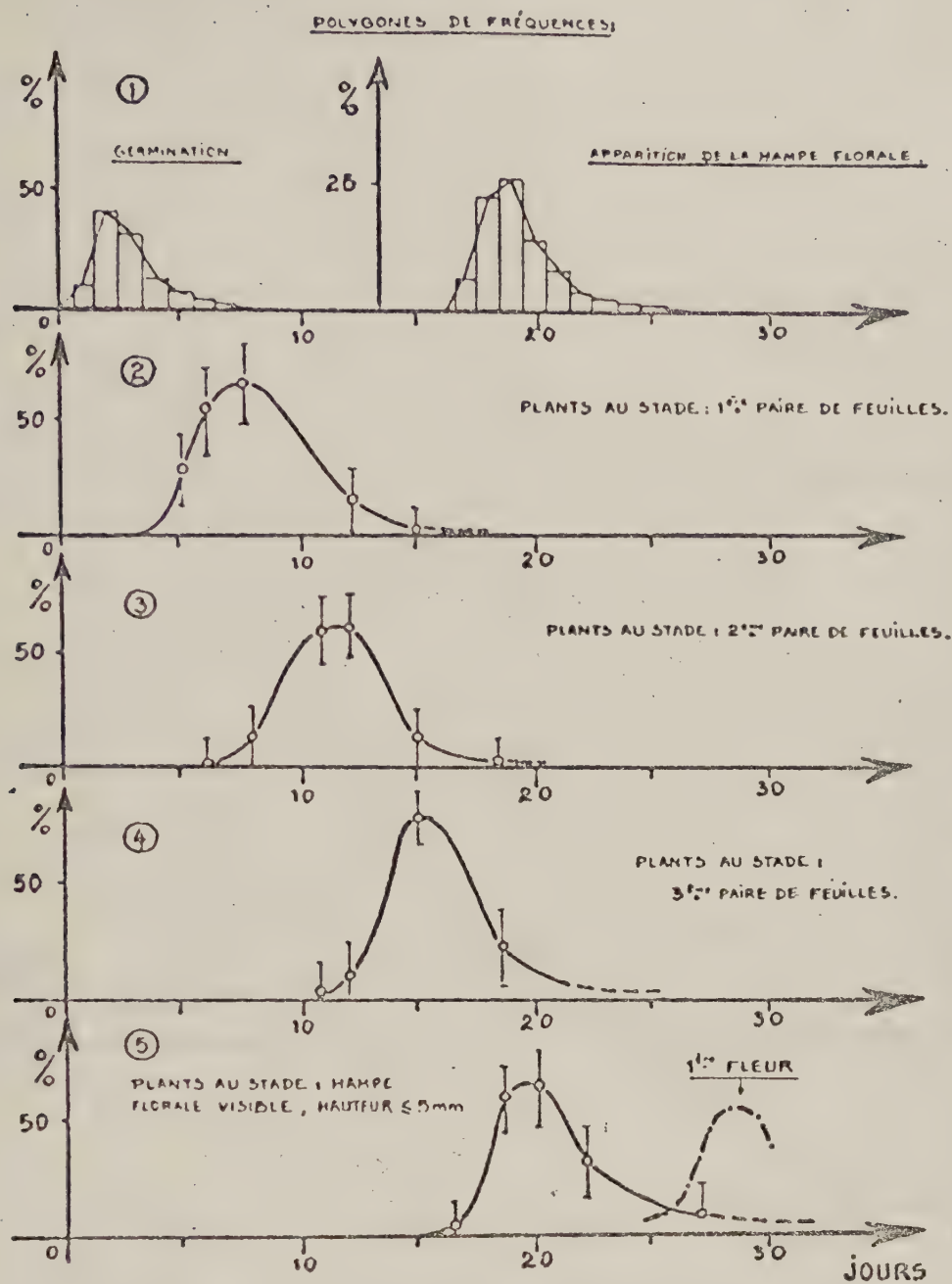


Fig. IV - Succession des stades physiologiques au cours du cycle végétatif d'Arabidopsis thaliana en culture artificielle

- | | | |
|------|---------------------------|---|
| 1 -- | Polygones de fréquences : | germination et apparition des hampes |
| 2 - | Plants au stade | : 1 ^{ère} paire de feuilles |
| 3 - | Plants au stade | : 2 ^{ème} paire de feuilles |
| 4 - | Plants au stade | : 3 ^{ème} paire de feuilles |
| 5 - | Plants au stade | : hampe visible (≤ 5 mm) - 1 ^{ère} fleur(---.) |

...

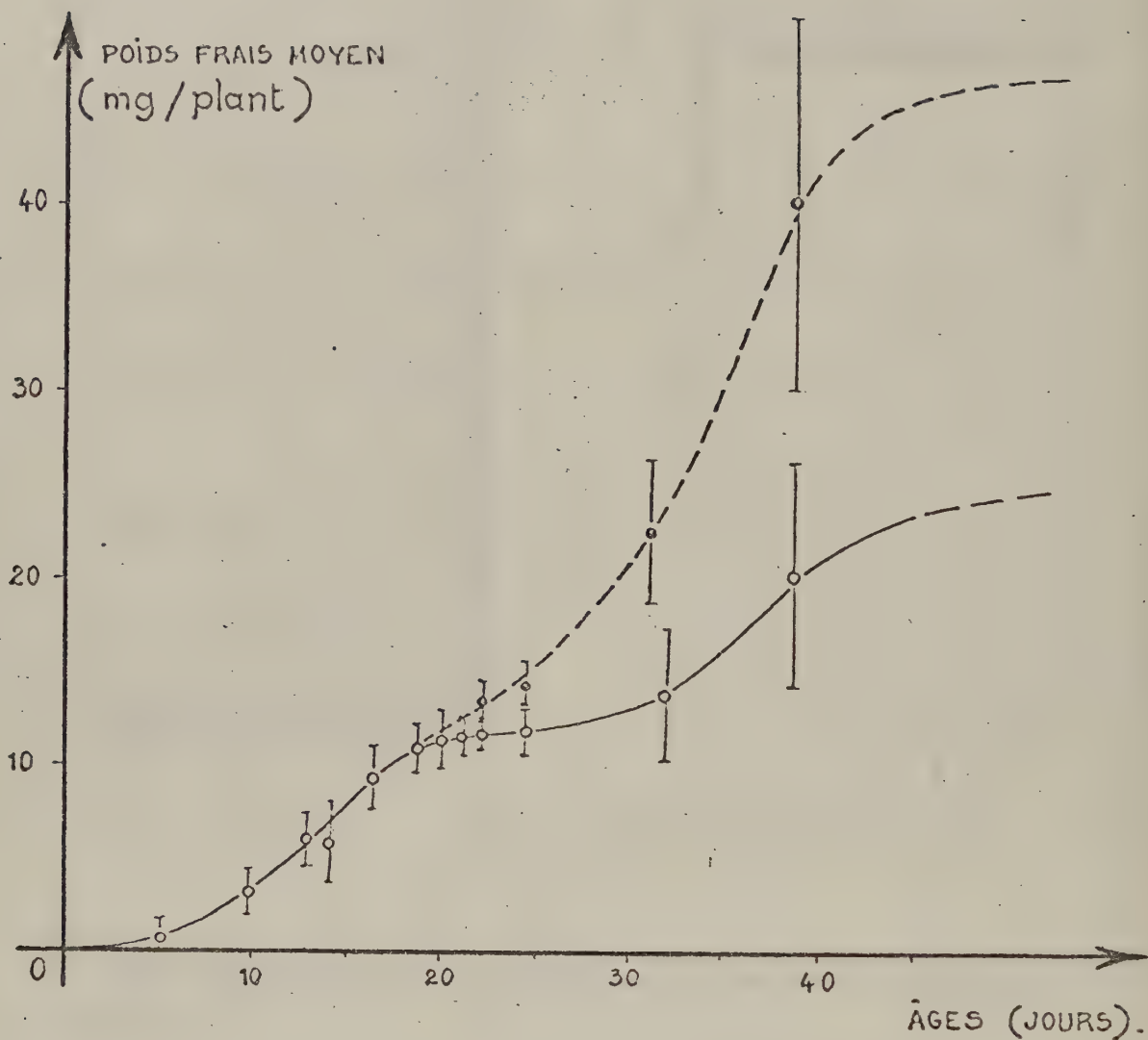


Fig. (V) - Evolution du poids des plants normaux d'Arabidopsis au cours du développement

- { - Poids de la rosette :
- { - Poids total (hampe comprise) : ----

Les résultats sont indiqués en poids frais. Le poids sec représente 10 ± 1 % de ces chiffres

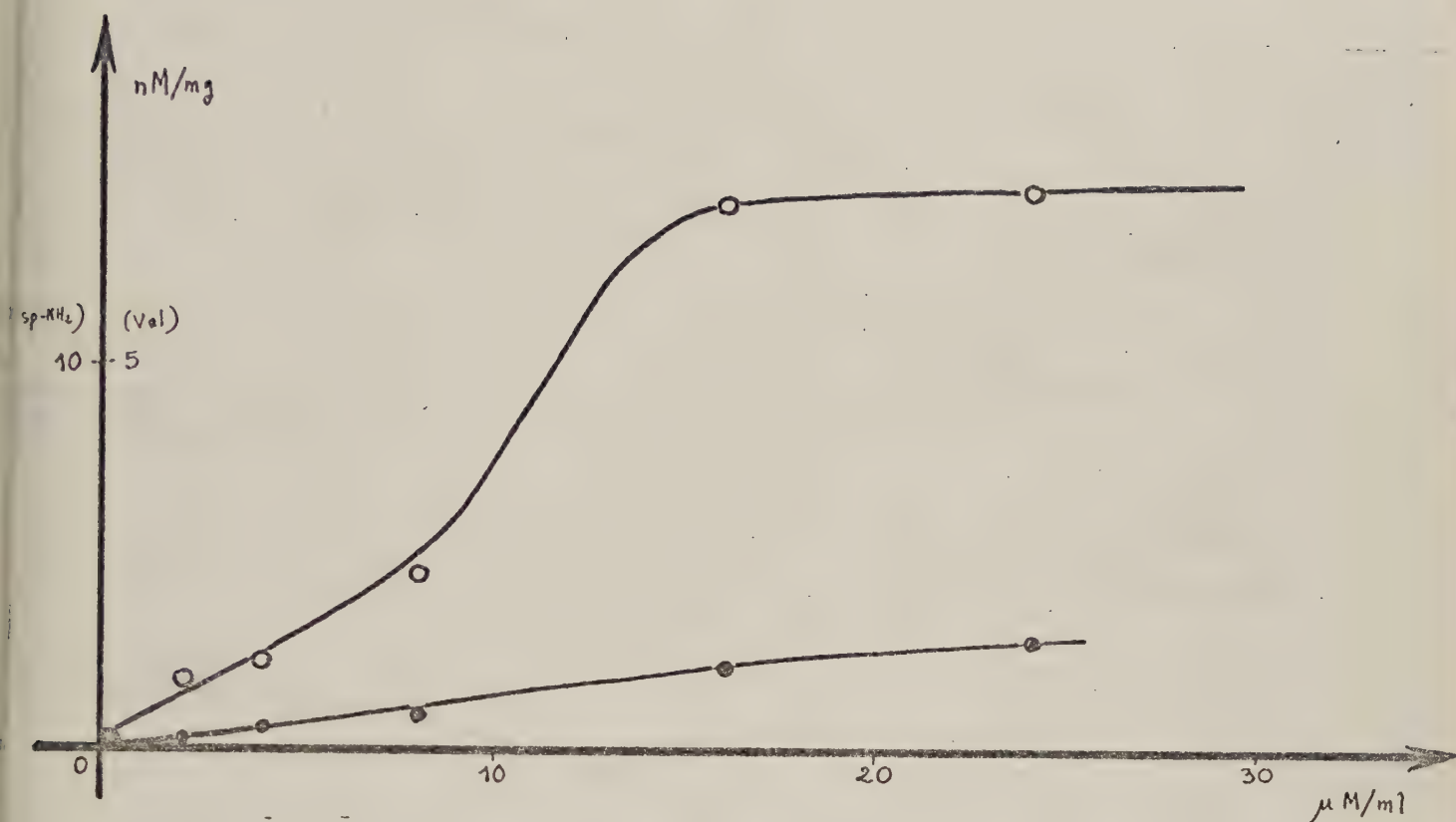


Fig. (VI) - Courbe d'augmentation de teneurs en asparagine et en valine en fonction de la concentration en leucine externe

{ asparagine : —○—
 { valine : —●—

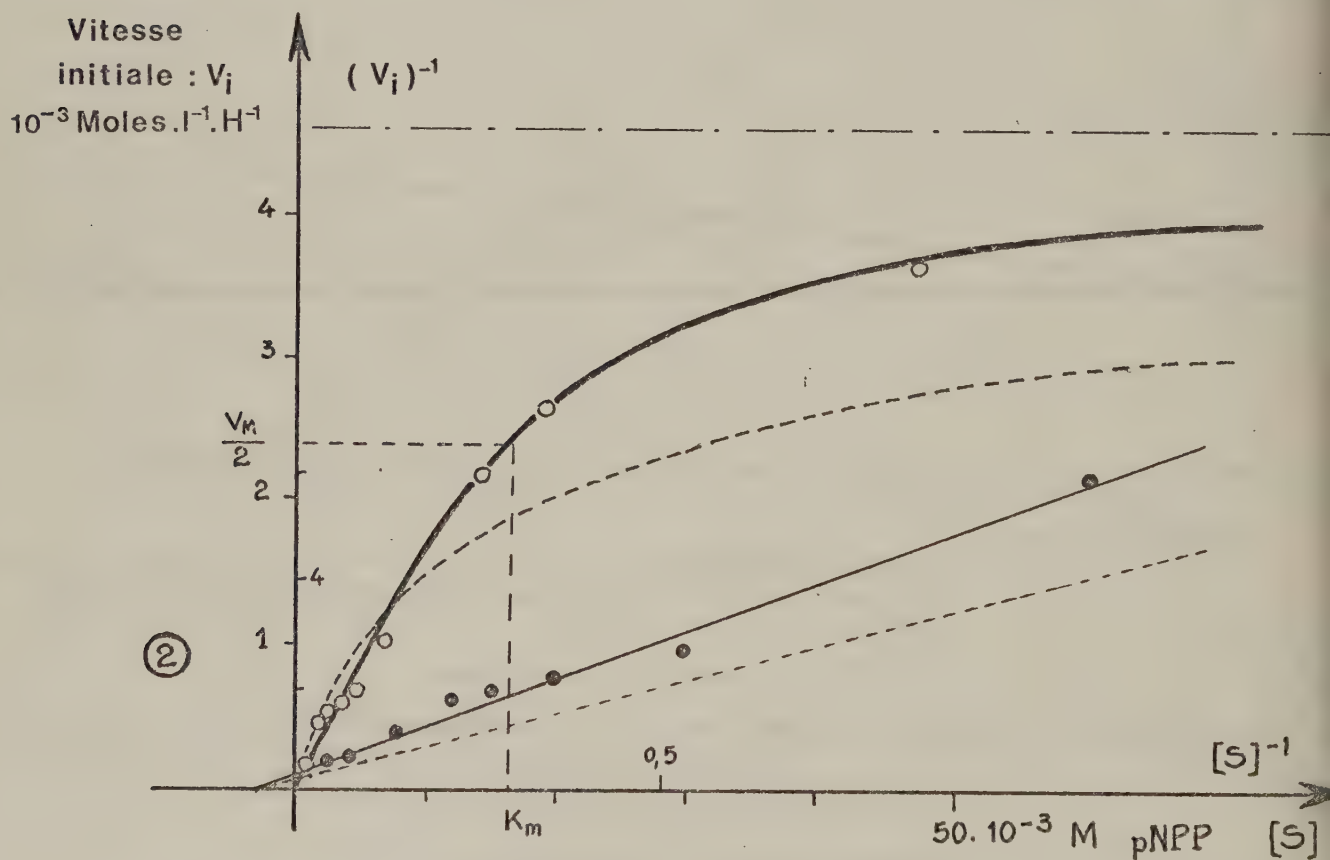
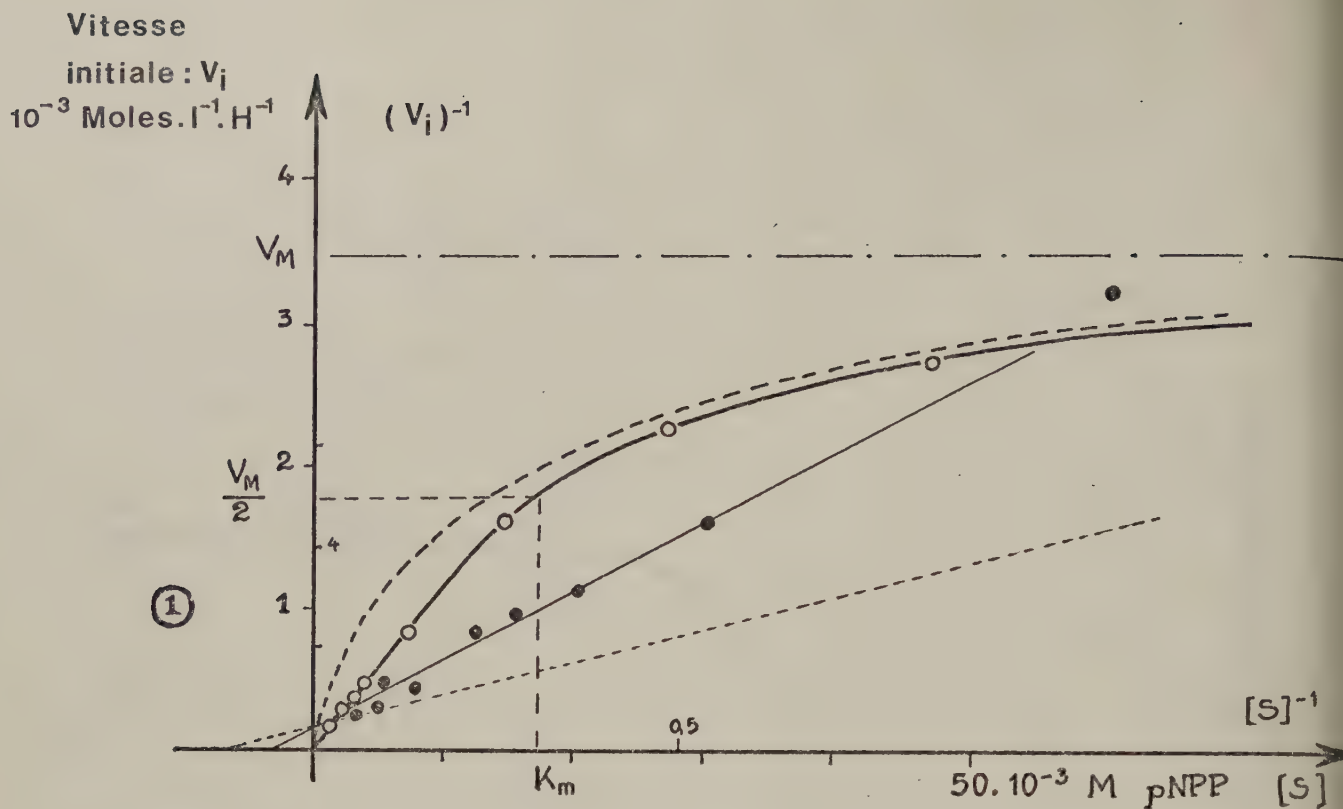


Fig. (VII) - Action de la leucine et de l'aza-leucine sur l'activité phosphatasique de l'Orge in vitro : plants normaux

(les courbes témoins sont représentées en pointillés)

(① + Leucine - ② + Aza-Leucine.)

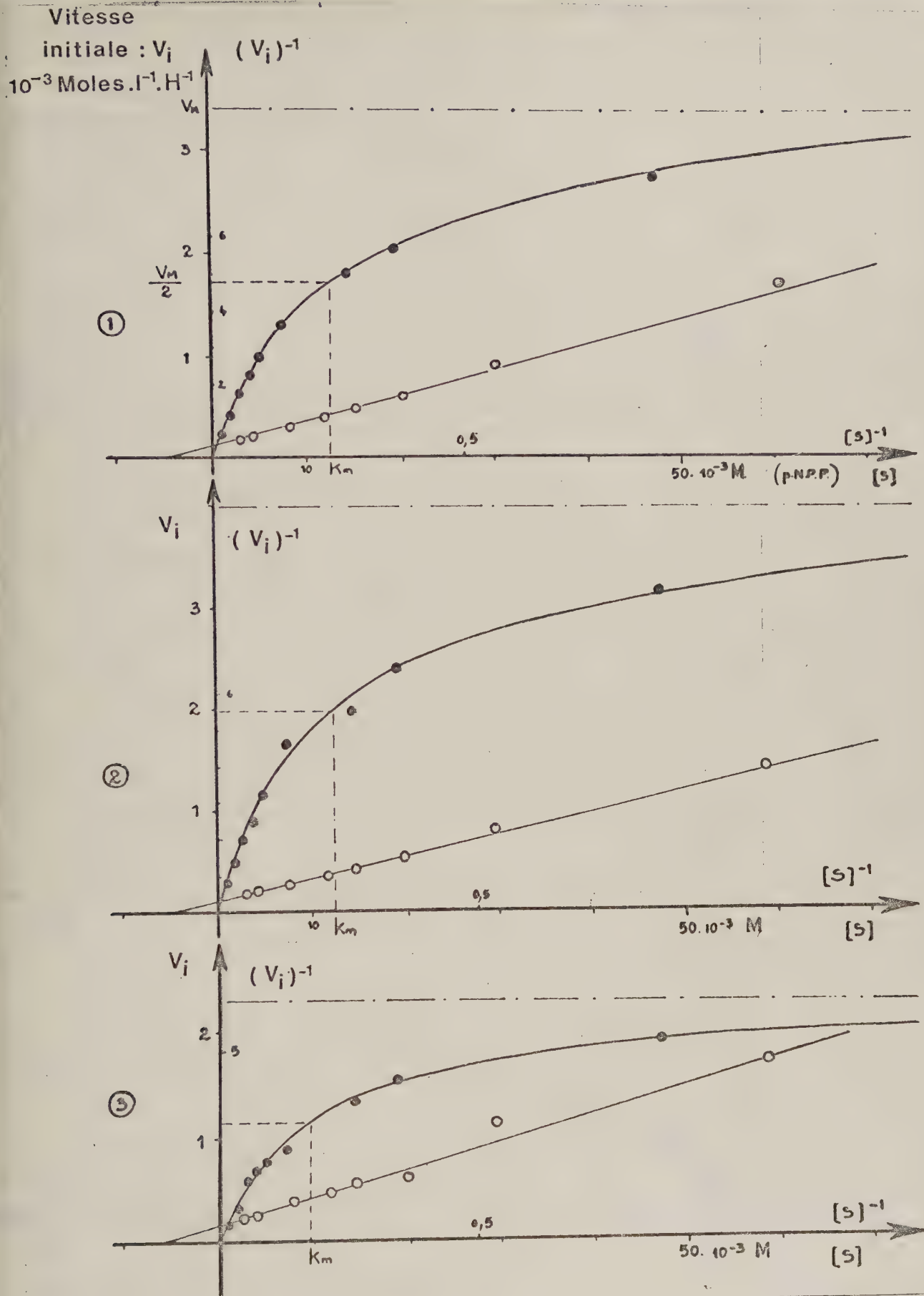


Fig. (VIII) - Action de la leucine et de l'aza-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge in vivo : plants témoins

① Temoin - ② Leucine ③ Aza-Leucine.

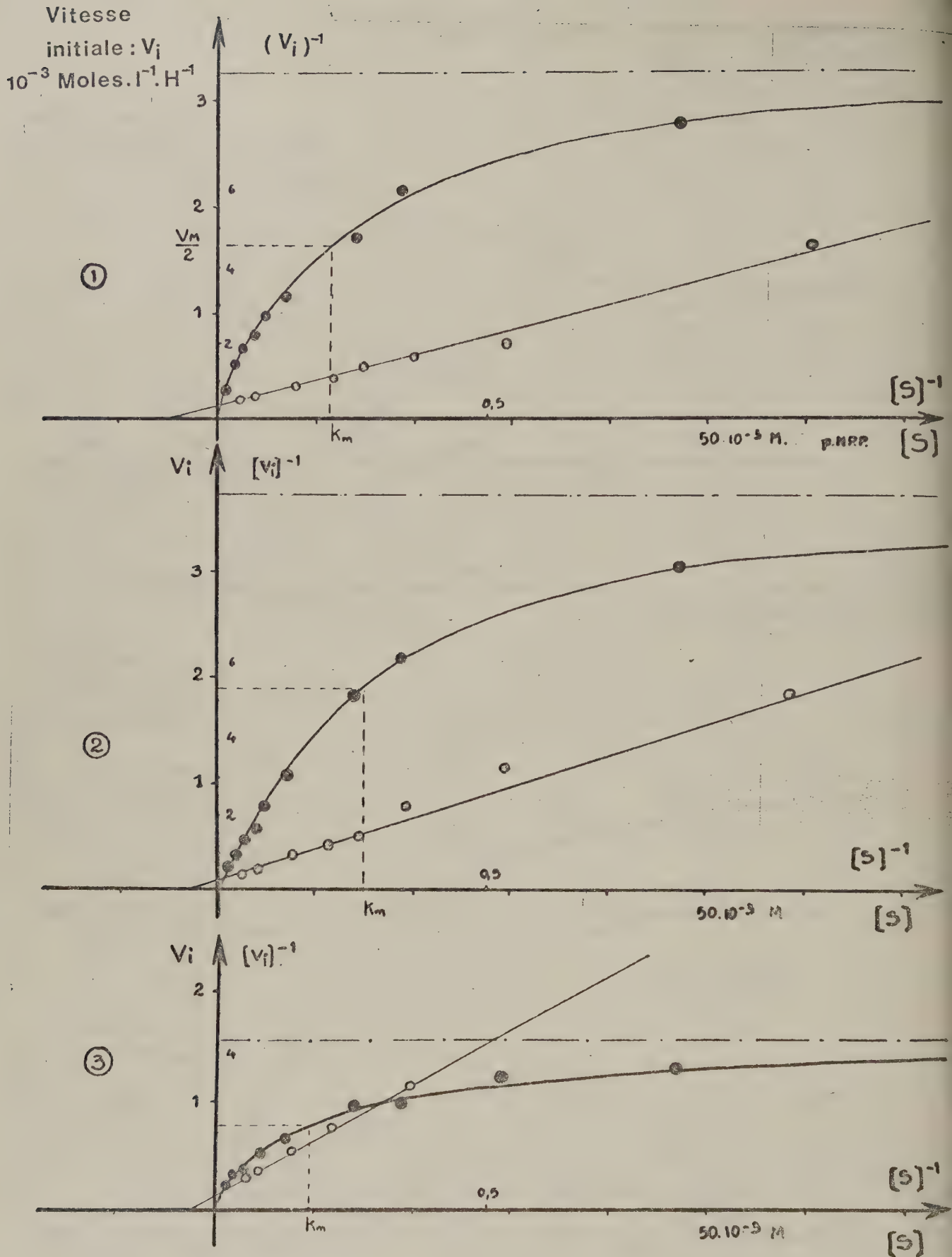


Fig. (IX) - Action de la leucine et de l'aza-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge in vivo : mutants V_1

① Témoin - ② Leucine ③ Aza-leucine.

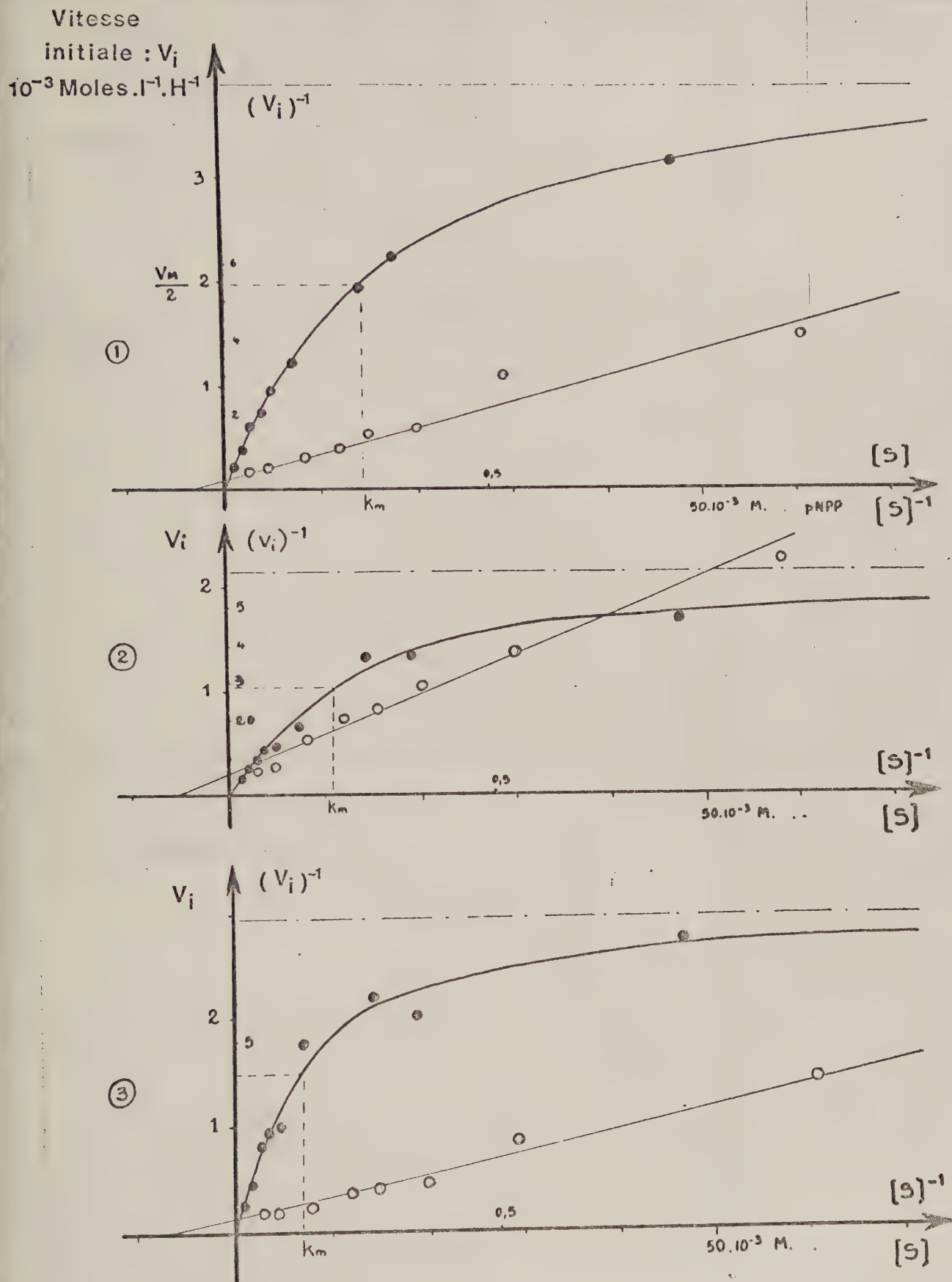


Fig. (X) - Action de la leucine et de l'aza-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge in vivo : mutants V_2

① Temoin - ② Leucine. ③-Aza-Leucine.

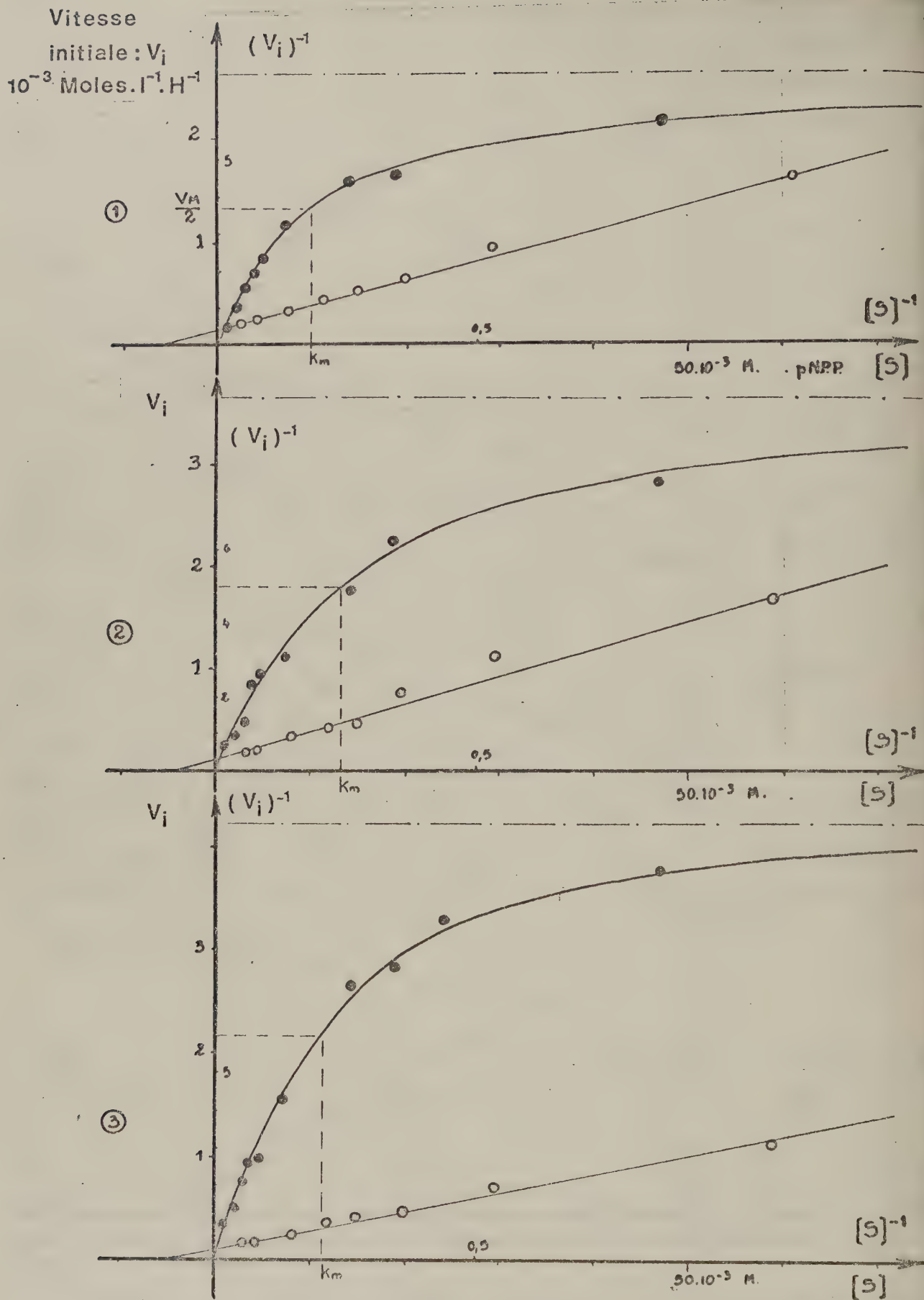


Fig. (XI) - Action de la leucine et de l'aza-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge in vivo : mutants V_3

① Témoin . ② Leucine . ③ Aza-leucine .

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Cristaux d'acides-amino-étalons (série L) obtenus en présence de glycérine

grandissement : x 480

- | | | |
|-------------------|---|-----------------------|
| 1 - L. Ornithine | a-b associations en "oursins" | |
| | c-d-e- cristaux géométriques (trapèzes) | |
| 2 - L. Lysine | - formes en "châtaignes" | |
| 3 - L. Histidine | | |
| 4 - L. Arginine | | |
| 5 - L. Sérine | a - trapèzes tronqués | b - Polyèdre et macle |
| | c - hexagones allongés | |
| 6 - L. Glycocolle | a - hexagone tronqué | b - losange typique |
| | c - houppe | d - parallélogramme |

PLANCHE II

Cristaux d'acides-amino-étalons (suite)

- | | | |
|-------------------------|--|------------------------------------|
| 1 - Acide L. Aspartique | a - formes étoilées | b - détail |
| 2 - L. Asparagine | ab - formes hexagonales et parallélogrammes tronqués | |
| | c - rectangles | |
| 3 - Acide L. Glutamique | a - forme réseau | b - oursins et formes polyédriques |
| | c - forme géométrique | |
| 4 - L. Glutamine | a - associations en houppes étalées | |
| | b - trapèze allongé | |

PLANCHE III

Cristaux d'acides-amino-étalons (suite)

- | | | |
|------------------|--|--|
| 1 - L. Thréonine | a - associations, formes à angles arrondis | |
| | b - hexagones asymétriques irréguliers | |
| 2 - L. Alanine | a - formes géométriques simples (rectangles, parallélogrammes) | |
| | b - associations | |
| 3 - L. Proline | - aiguilles (rectangles allongés) | |

- 4 - L. Phényl-alanine
- 5 - L. Méthionine
- 6 - L. Tyrosine : houppes et "oursins"
- 7 - L. Valine a - différents hexagones
 b - associations en étoiles

PLANCHE IV

Cristaux d'acides-amino-étalons série L obtenus en présence de glycé
(suite)

- 1 - L. Iso-leucine a - formes naissantes en étoiles
 b - aiguilles réunies en étoiles
 c - formes en tablettes géométriques
 d-e-f- association de petites tablettes en
 étoiles
- 2 - L. Leucine a-b- formes naissantes en étoiles
 c - sphérocristaux (pointes aigües)

PLANCHE V

Détection histochimique des sucres - coupes paraffine - fixation alcool-formol

grandissement : x 1080

1 - Orge Témoin, lumière normale

- a - Anisaldéhyde - Parenchyme - Granulations chloroplastiques dont un grain auréolé, dans un gros chloroplaste
- b - Anisaldéhyde - Zone juxtavasculaire - Excrétion de sucres par un gros chloroplaste et granule auréolé dans un petit (rare)
- c - Anisaldéhyde - Parenchyme - Richesse en sucres des petits chloroplastes en bordure des cellules
- d - Phtalate d'aniline - Parenchyme - Richesse en sucres des petits chloroplastes plaqués en bordure des cellules

2 - Orge Témoin, lumière atténuée

- a - Urée chlorhydrique - zone vasculaire - granule à auréole réfringente dans un gros chloroplaste - richesse en sucres des petits
- b - Anisaldéhyde - Parenchyme - Répartition homogène des chloroplastes dans les cellules - tendance à dégénérer des gros chloroplastes.

3 - Mutant V₁ - Lumière normale

- a - Phtalate d'Aniline - Zone vasculaire - gros chloroplastes granuleux dégénérescents
- b - Anisaldéhyde - zone péri-vasculaire - chloroplastes riches en sucres dont un gros avec granule à auréole

4 - Mutant V₁ - Lumière atténuée

- a - Anisaldéhyde - parenchyme - chloroplastes moyens marqués et petits très marqués (riches en sucres)

...

PLANCHE VI

Détection histochimique des sucres de l'Orge (suite) (x 1080)

1 - Mutant V₂ - lumière normale

- a - Anisaldéhyde - Parenchyme - Chloroplastes moyens et pe
très marqués
- b - mêmes conditions avec en plus un gros chloroplaste uni
sauf un grain périphérique non auréolé
- c - Urée chlorhydrique - Parenchyme - un gros chloroplaste
granuleux ainsi que des moyens et petits avec grains
périphériques et d'excrétion (sans dégénérescence)

2 - Mutant V₂ - Lumière atténuée

- a - Urée chlorhydrique - Zone vasculaire - petits et gros
chloroplastes à fortes granulations
- b - Anisaldéhyde - Parenchyme - Petits chloroplastes plus
marqués en leur centre et moyens plus marqués en périphé
rie

3 et 4 - Mutant V₃ - Lumière normale

- 3 a - Urée chlorhydrique - Zone vasculaire - gros chloroplas
à 6 grains très nets
- 3 b - Anisaldéhyde - Zone vasculaire - Sucre cytoplasmique -
gros chloroplastes à granules auréolés et dégénérescen
- 4 a - Phatalate d'aniline - Parenchyme - Petits et gros
chloroplastes périphériques chargés en sucres
- 4 b - Anisaldéhyde - Parenchyme - Chloroplastes moyens pér
phériques riches en sucres (chlp. médians plus nombreux
que chez les témoins)
- 4 c - Urée chlorhydrique - Parenchyme - Gros chloroplastes
avec grains (fructose compris) en bordure et au centre

5 - Mutant V₃ - Lumière atténuée

- a - Anisaldéhyde - Zone périvasculaire - Un gros chloroplas
à granule auréolé
- b - Urée chlorhydrique - Parenchyme - Gros chloroplaste pl
uni et à granule auréolé - Zone de dégénérescence (à
l'approche des régions péri-vasculaires) et sucres cyt
plasmiques
- c - Phthalate d'aniline - Zone vasculaire - présence de suc
dans le liber et les vaisseaux

PLANCHE VII

Détection histochimique et cyto-cristallographique des amino-acides chez Tradescantia (Montage du tissu frais dans la glycérine) (x 480)

1 - Formation des sphérocristaux de leucine

- a - début de formation des branches (cellules)
- b - idem. sur chloroplaste isolé
- c - sphérocrystal commençant à déborder d'un chloroplaste isolé
- d-e - idem. dans une cellule
- f - sphérocrystal ayant traversé les parois du chloroplaste
- g - sphérocristaux élaborés

2 - Détection des amino-acides avec la ninhydrine

- a - réactions positives chloroplastiques : montage dans la blannose
- b - réactions positives chloroplastiques : montage au sirop d'Apathy
- c - réactions positives chloroplastiques : montage dans la glycérine

3 - Cas particuliers de détections histochimiques

- a - réactions positives à la ninhydrine sur chloroplastes isolés
- b - noyau et nucléole sans amino-acides libres et chloroplastes marqués
- c-d - détection des amino-acides libres sous forme de sel de cuivre (avec CuSO_4) - montage dans le sirop d'Apathy (révélation du cuivre par H_2S et la laque d'hématoxyline)

4 - Conjugaison des techniques de cristallisation et de réaction chimique

- a-b - leucine en sphérocristaux et autres amino-acides révélés par la ninhydrine (réactif : Glycérine + Ninhydrine dans l'alcool)
- c - Coexistence des deux types de caractérisation au sein d'un même chloroplaste isolé

PLANCHE VIII

Détection cytocristallographique de plusieurs types d'acides-amino
chez Tradescantia (x 480)

1 - Glycocolle : a-b-c-d - Losanges

2 - Comparaisons Alanine - Sérine - Glycocolle

- a - glycocolle (losange)
- b - alanine (parallélogramme)
- c - sérine (pentagone à pointe non tronquée)
- d - alanine (forme hexagonale allongée)

3 - a-b - Valine (forme hexagone)

- c - cristal en étoile à branches larges : valine
- d - cristal intra-chloroplastique en trapèze rectangle (ala
- e - hexagone asymétrique : sérine

4 - Asparagine et alanine

- a - carrés cytoplasmiques
- b-c - carrés chloroplastiques
- d-e - formes rectangles
- f - forme trapèze rectangle : alanine

5 - a - Sérine hexagones allongés (angles obtus)

5 - b - Leucine + Glycocolle + Asparagine en coexistence
(cristallisation sous glycérine + butanol - 1)

PLANCHE IX

A - Incorporation de L. Leucine-¹⁴C dans les chloroplastes d'Arabidopsis et d'Orge : Autohistoradiographies

1 - Localisation chez Arabidopsis

- a et b - marquage des chloroplastes dans les cellules
- c et d - localisations dans des chloroplastes isolés :
 - c - interne
 - d - périphérique

2 - Localisation chez l'Orge

- a - marquage des chloroplastes et des vaisseaux
- b - localisations internes dans un chloroplaste isolé

B - Activités phosphatasique et ATP^{ase} alcalines chez l'Orge

- 3 et 4 - Phosphatase alcaline
 - 3a - lumière normale - vue d'ensemble (x 100)
 - 3b - lumière atténuée - vue d'ensemble : activité accrue
 - 3c - lumière normale - localisations chloroplastiques (x 720)
 - 4a - Lumière normale - Détail, zone périvasculaire (x 720)
 - 4b - Lumière atténuée - Détail, zone périvasculaire : activité accrue
- 5 - ATP^{ase} alcaline
 - a - lumière normale - vue d'ensemble (x 100)
 - b - lumière normale - vue détaillée (x 320)
 - c - Lumière atténuée - activité réduite - localisation dans un chloroplaste isolé (x 720)

PLANCHE X

Influence de la leucine sur l'activité de la phosphatase et de l'ATP^{ase} chez l'Orge

1 - Phosphatase, lumière normale - Activation par la leucine
($10^{-3}M$)

a - vue d'ensemble (x 100)

b - vue de détail (x 720)

2 - Phosphatase, lumière atténuée - leucine $10^{-3}M$

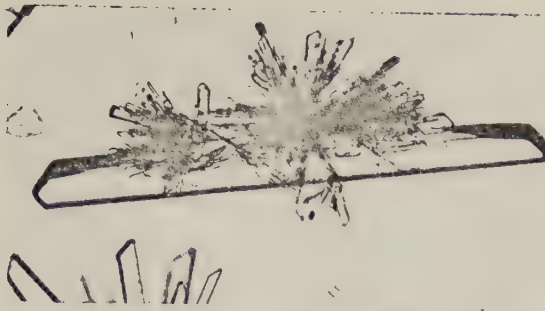
a - vue d'ensemble : activation

b - vue de détail - activation et diffusion d'activité
hors des chloroplastes, vers le cytoplasme

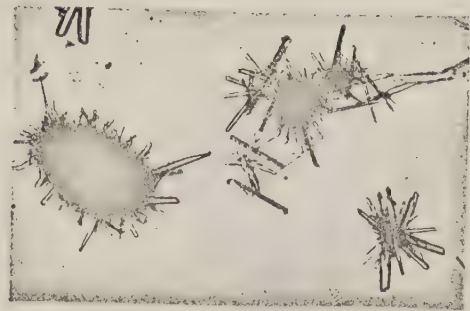
3 - ATP^{ase} - leucine $10^{-3}M$

a - vue d'ensemble : activité réduite en lumière atténuée
même en présence de leucine

b - vue d'ensemble : activité plus forte en lumière normale
(même dose de leucine que 3a)



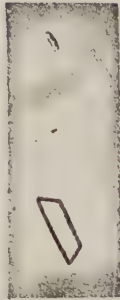
1a



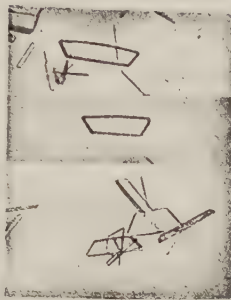
1b



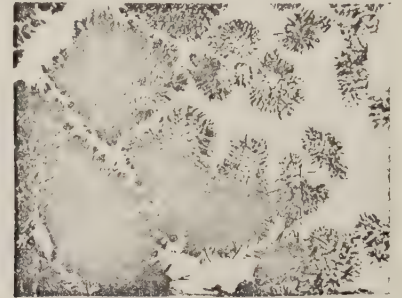
1.c



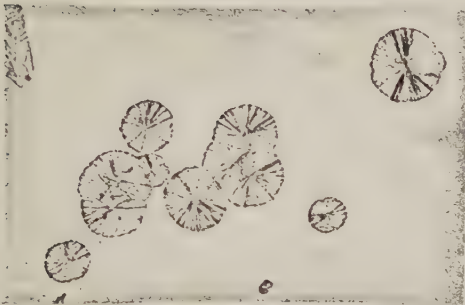
1.d



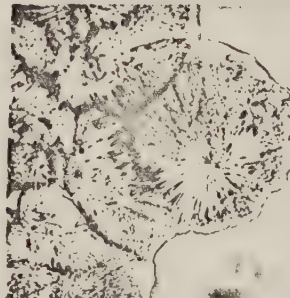
1.e



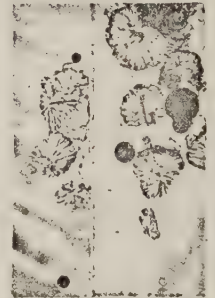
2



3.



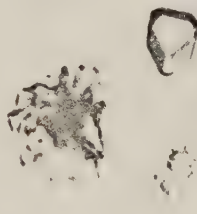
4.a



4.b



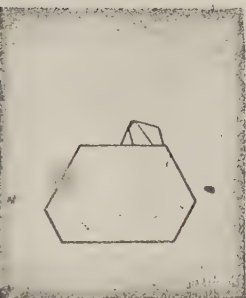
5.a



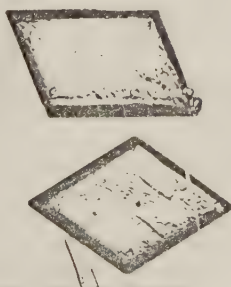
5.b



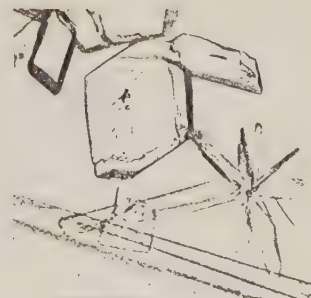
5.c



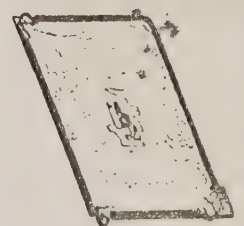
6.a



6.b



6.c



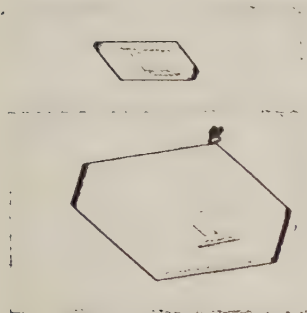
6.d



1.a



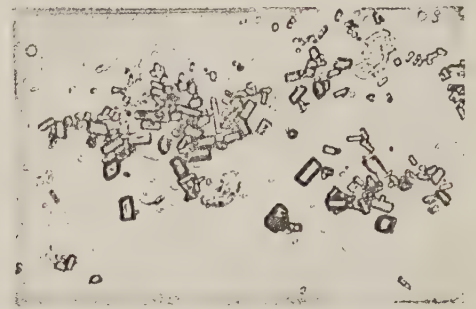
1.b



2.a



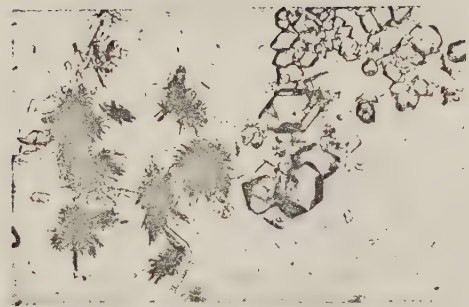
2.b



2.c



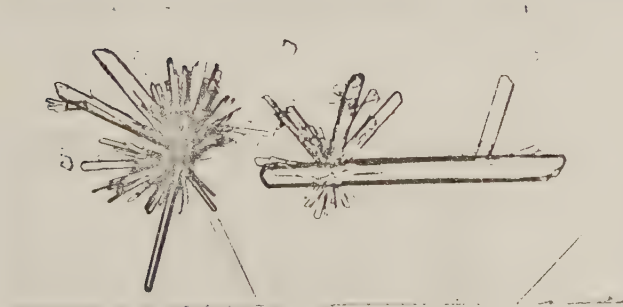
3.a



3.b



3.c



4.a



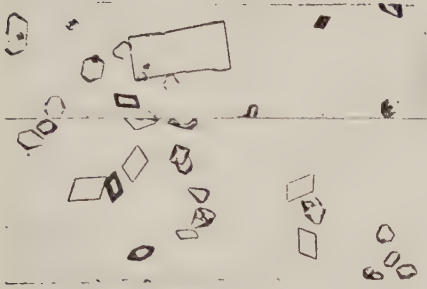
4.b



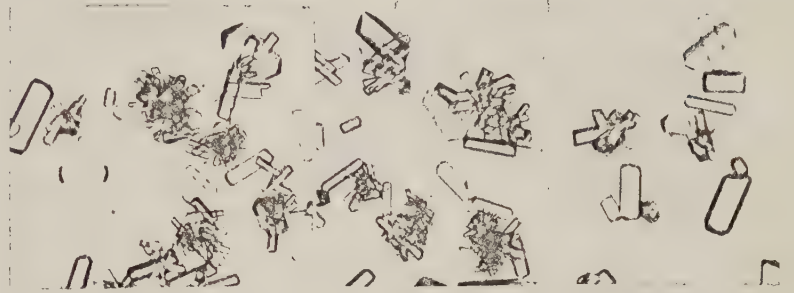
1.a



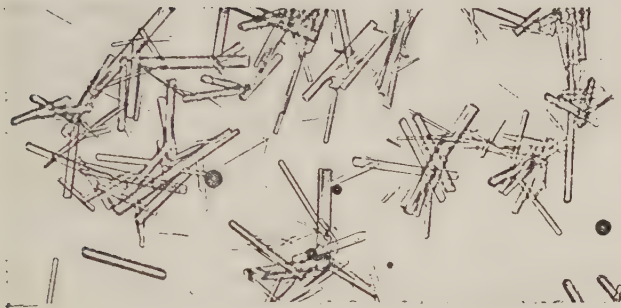
1.b



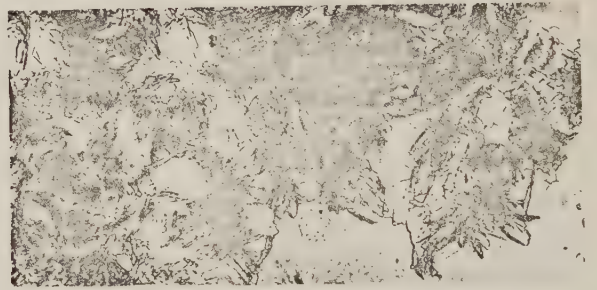
2.a



2.b



3



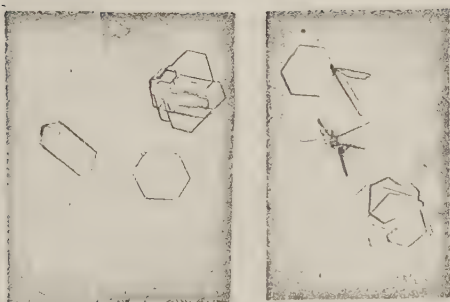
4



5



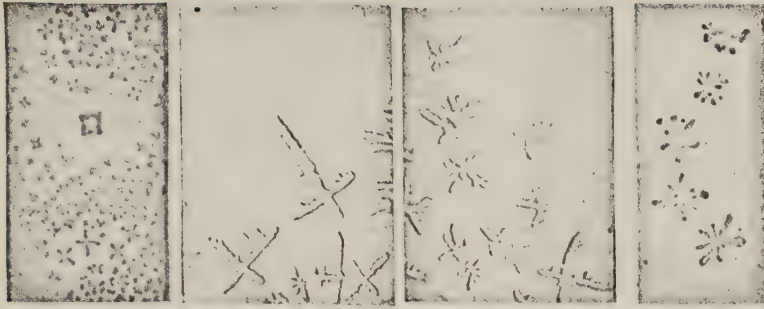
6



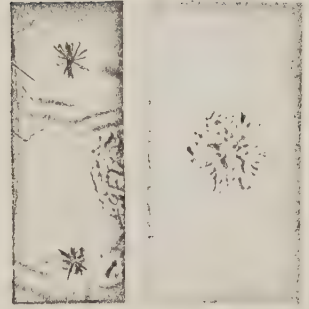
7.a



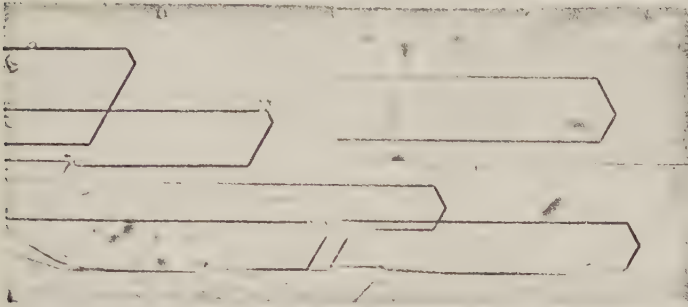
7.b



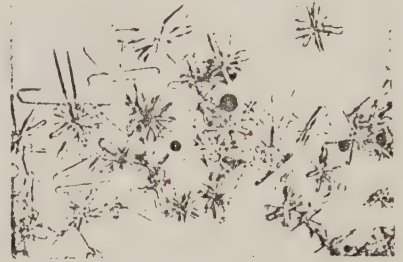
a



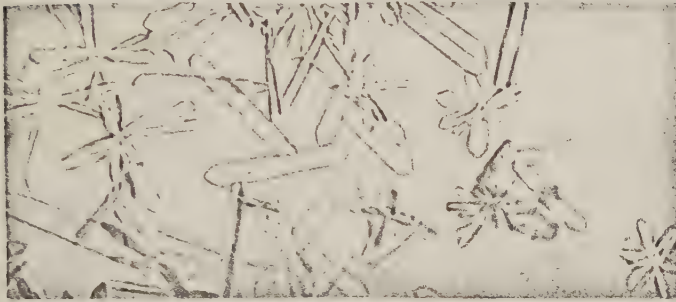
b



c



d

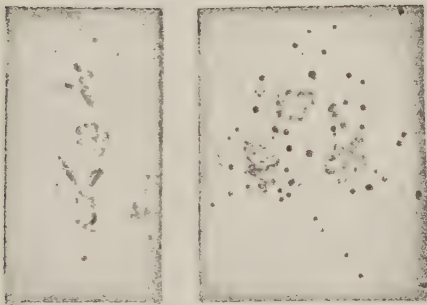


e

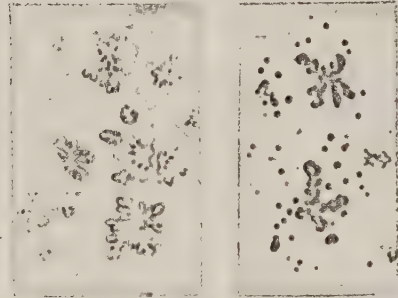


f

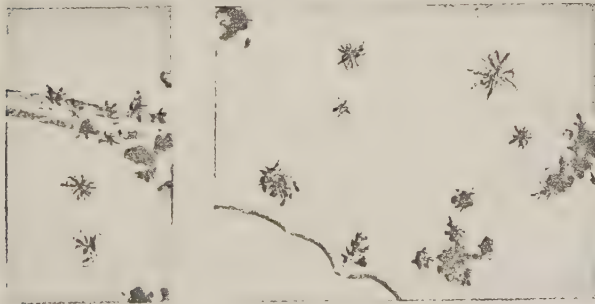
1_



a



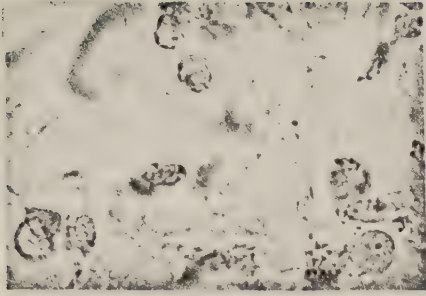
b



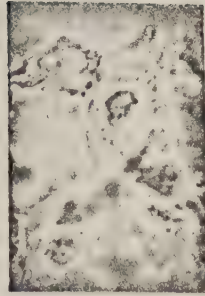
c



2_



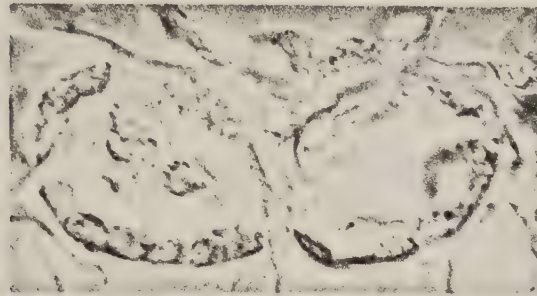
1.a



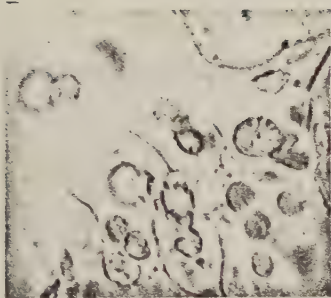
1.b



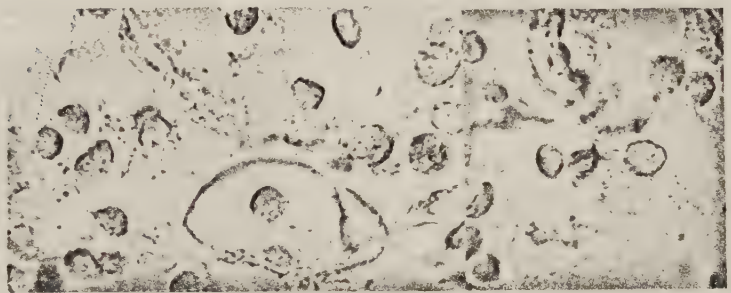
1.c



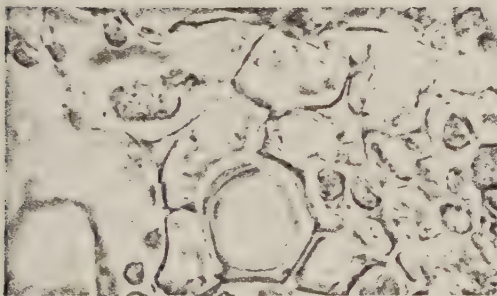
1.c



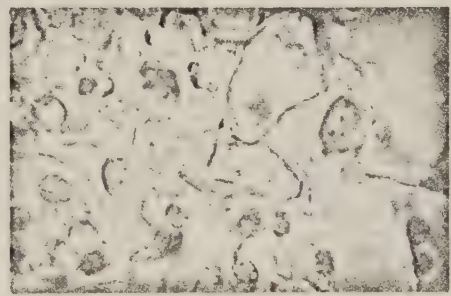
2.a



2.b



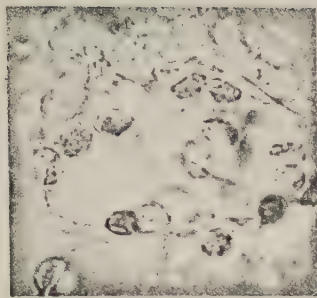
3.a



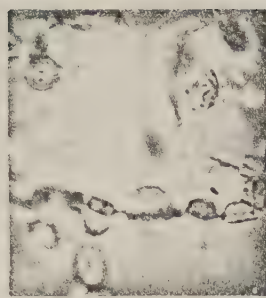
3.b



4.a



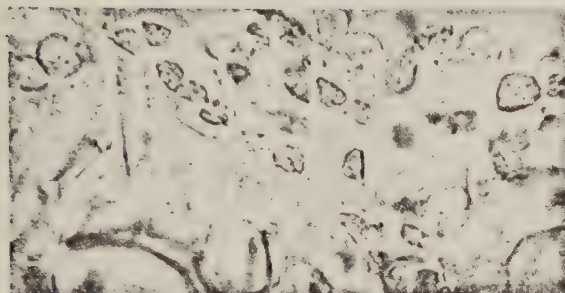
1.a



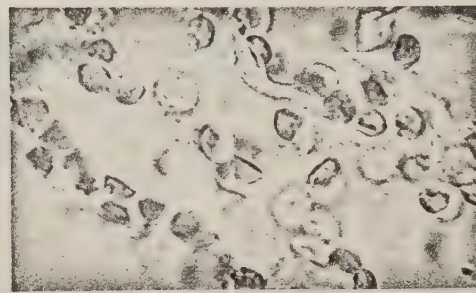
1.b



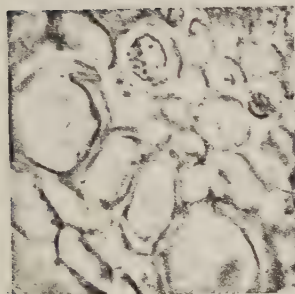
1.c



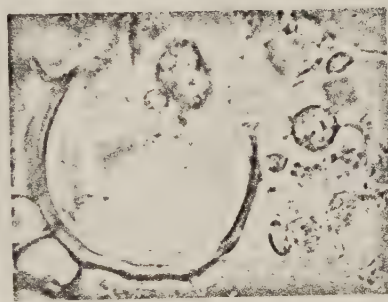
2.a



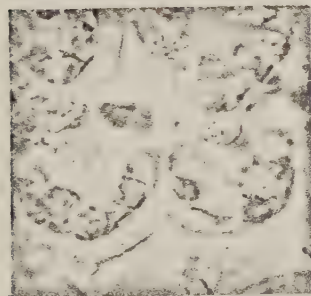
2.b



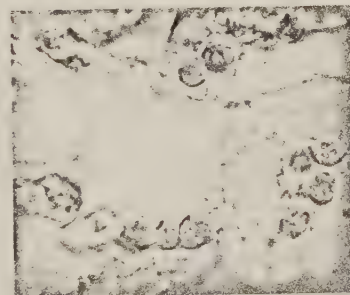
3.a



3.b



4.a



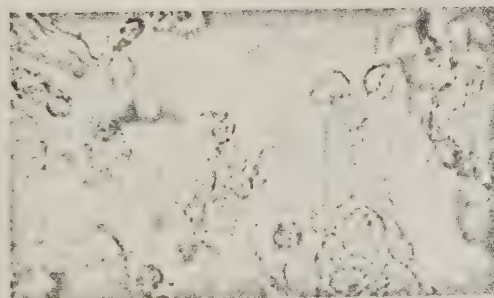
4.b



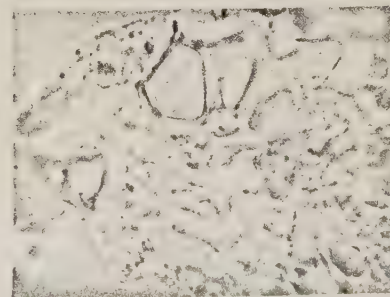
4.c



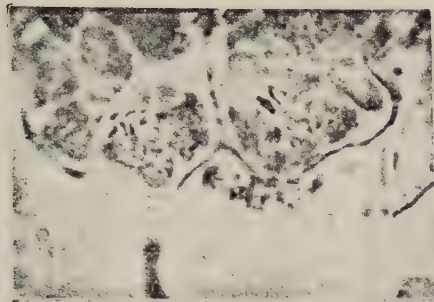
5.a



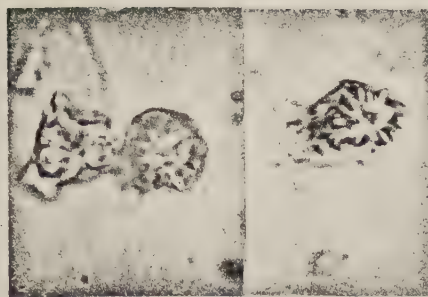
5.b



5.c



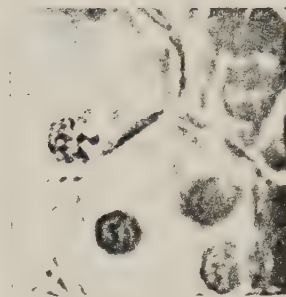
1.a



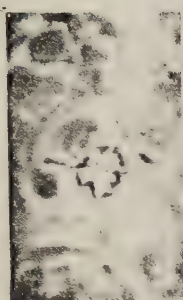
1.b



1.c



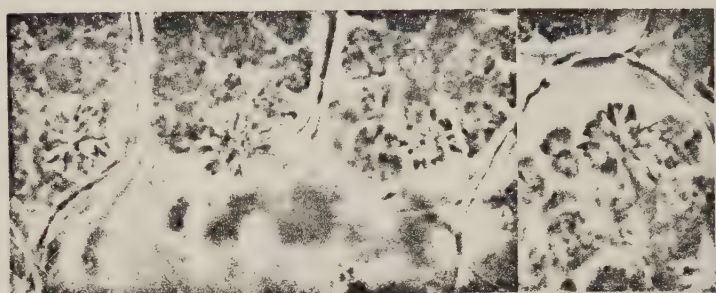
1.d



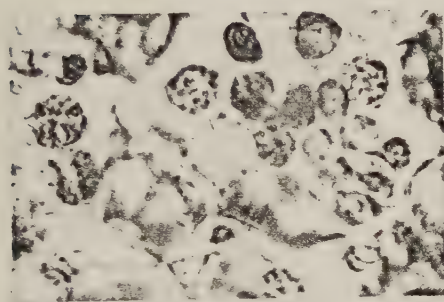
1.e



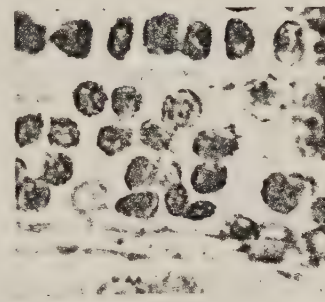
1.f



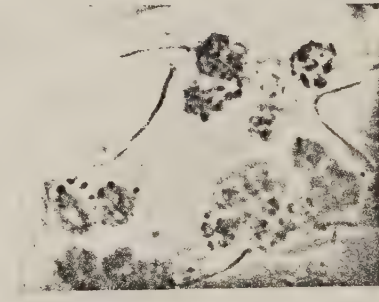
1.g



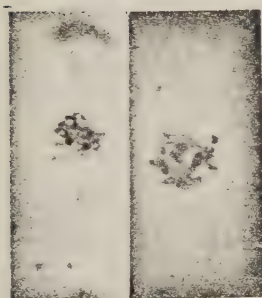
2.a



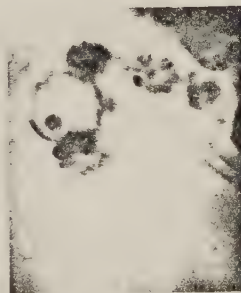
2.b



2.c



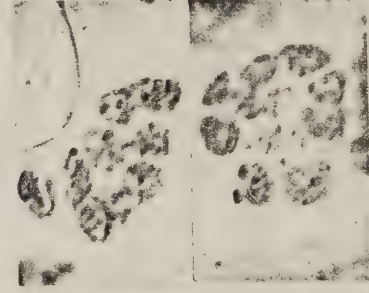
3.a



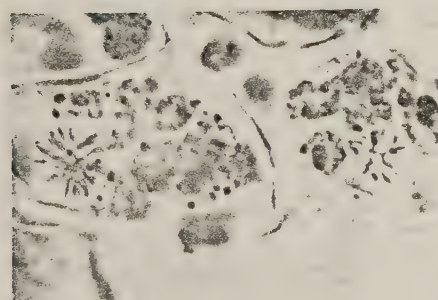
3.b



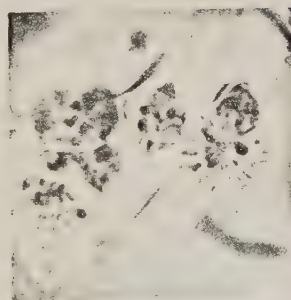
3.c



3.d



4.a



4.b



4.c



1.a



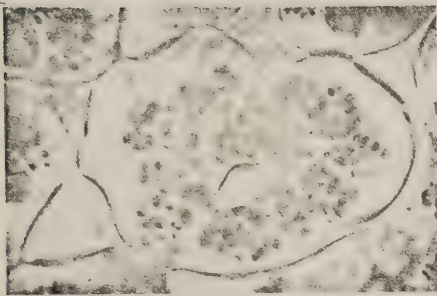
1.b



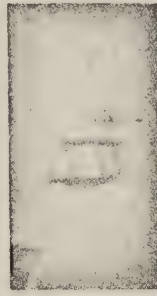
1.c



1.d



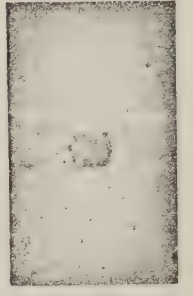
2.a



2.b



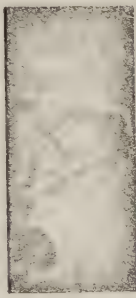
2.c



2.d



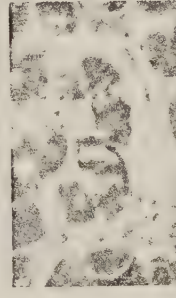
3.a



3.b



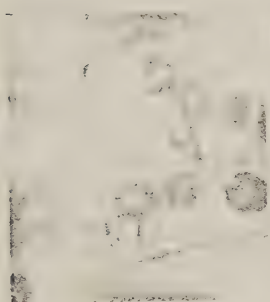
3.c



3.d



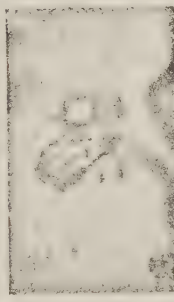
3.e



4.a



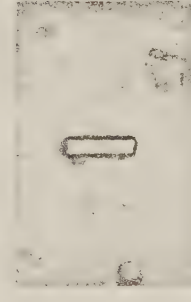
4.b



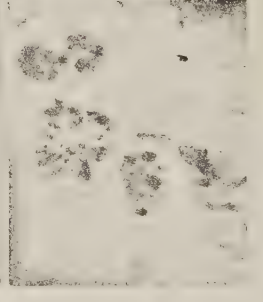
4.c



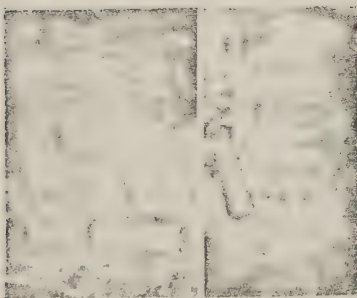
4.d



4.e



4.f

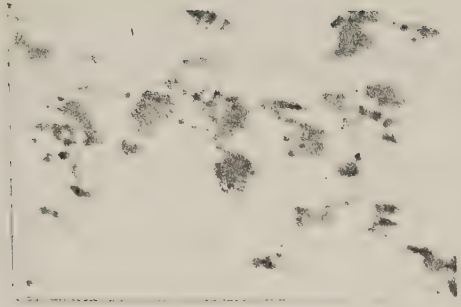


5.a

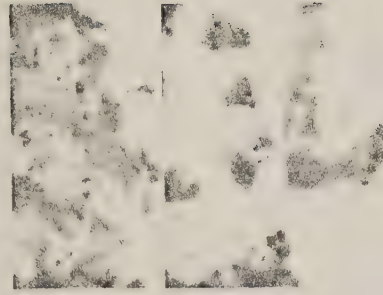


5.b

A



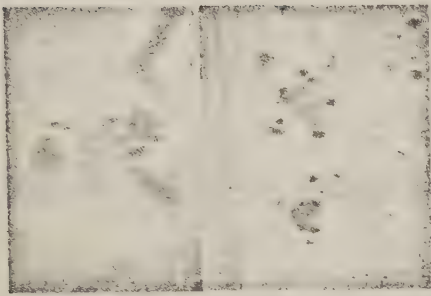
1.a



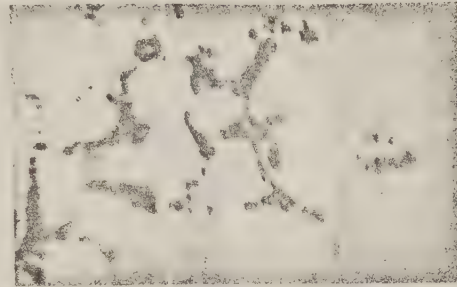
1.b



1.c



1.d



2.a

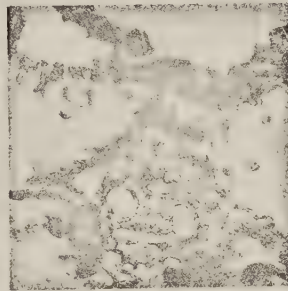


2.b

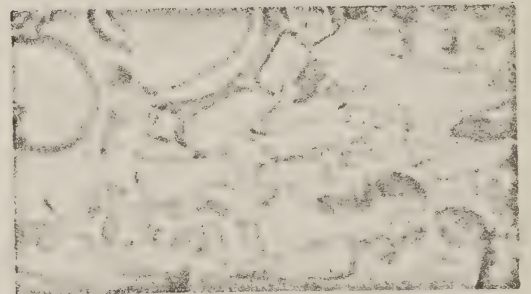
B



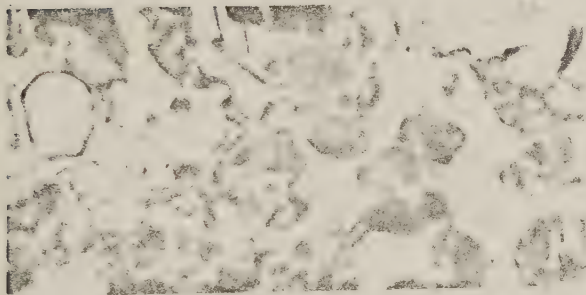
3.a



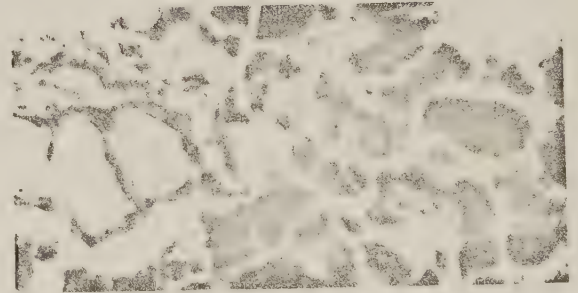
3.b



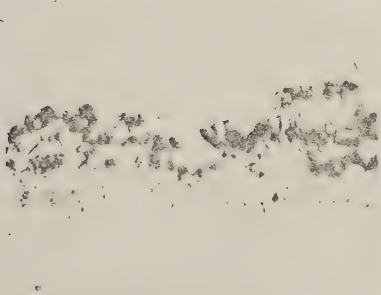
3.c



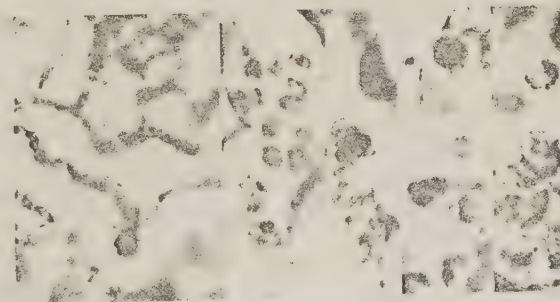
4.a



4.b



5.a



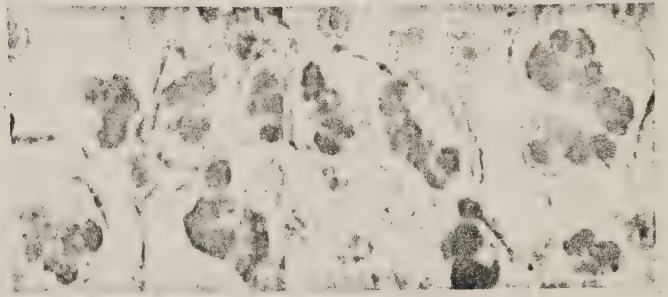
5.b



5.c



1.a



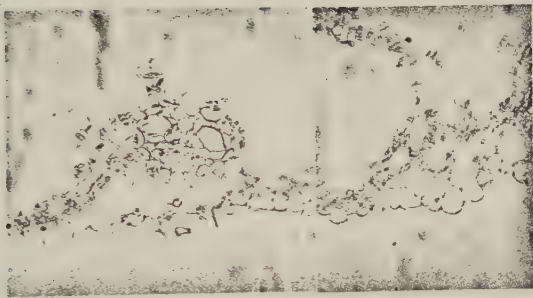
1.b



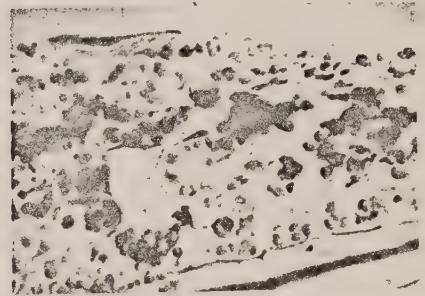
2.a



2.b



3.a



3.b

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	2
MATERIEL ET TECHNIQUES	
Matériel végétal.....	9
Technique - I - Techniques de cultures.....	10
II - Techniques biochimiques.....	13
III - Techniques radiochimiques...	25
IV - Techniques histochimiques et cytologiques.....	27
V - Techniques biométriques.....	29
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIOCHIMIQUE DES PLANTES <u>NORMALES ET MUTEES</u>	
Chapitre I - Etude sur des rosettes de feuilles d' <u>Arabidopsis thaliana normales</u> et <u>mutées</u>	
A - Obtention des Mutants.....	31
B - Etude biochimique des <u>Témoins</u> au cours du développement.....	31
C - Etude des <u>Mutants "Viridis"</u> :	
1° en lumière normale.....	38
2° en lumières atténuées.....	43
D - Propriétés spectrales des pigments chlo- rophylliens et caroténoïdes isolés chez les plants <u>normaux</u> et " <u>Viridis</u> ".....	49
Chapitre II - Etude sur des plantules d' <u>Orge</u> <u>normales</u> et <u>mutées</u>	
A - Etude biochimique des Témoins au cours du développement.....	50
B - Etude de quelques <u>Mutants "Viridis"</u> viables (<u>V₁ V₂ V₃</u>).....	56
1° en conditions normales au stade huit et douze jours.....	56
2° au stade douze jours en lumière atténuée de courte et longue durée.....	58
3° au stade 12 jours après ablation de la feuille cotylédonnaire.....	60
4° au stade 12 jours en culture à basse température.....	61

...

C - Propriétés spectrales des pigments chlorophylliens et caroténoïdes isolés chez les plants <u>normaux</u> et " <u>Viridis</u> "	63
Chapitre III - Etude de quelques mutations chlorophylliennes plus avancées, vers les types " <u>Xantha</u> " et " <u>Albina</u> "	
A - Etude en lumière normale.....	64
B - Etude en lumière atténuée.....	66
Discussion sur la Première Partie.....	68
DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES SUR LE MECANISME DE QUELQUES TROUBLES METABOLIQUES DECELES CHEZ LES <u>MUTANTS</u>	
Chapitre I - Etude de quelques phénomènes de reverdissement chez l' <u>Orge</u>	
A - Pouvoir de reverdissement du <u>Mutant V₁</u> à température élevée.....	82
B - Pouvoir de reverdissement des <u>Mutants</u> " <u>Viridis</u> " après étiolement à l'obscurité totale.....	83
1° Reverdissement après étiolement de courte durée.....	83
2° Reverdissement après étiolement prolongé.....	84
Chapitre II - Etude comparée de l'incorporation d'acétate-1- ¹⁴ C dans les plants d' <u>Orge</u> normaux et " <u>Viridis</u> "	
A - Etude des pigments chlorophylliens.....	88
B - Etude des co-facteurs.....	89
C - Amino-acides libres.....	92
D - Etude des sucres.....	93
Chapitre III - Recherches préliminaires sur la localisation de quelques phénomènes métaboliques au niveau de la cellule et du chloroplaste	
A - Localisation histochimique de quelques métabolites chez l' <u>Orge</u> et chez <u>Tradescantia</u>	
1° Aperçu morphologique.....	96
2° Phosphatases et ATP ^{ases}	96
3° Sucres.....	97
4° Amino-acides libres.....	97
B - Etude biochimique comparée des amino-acides libres dans les chloroplastes et le cytoplasme isolés et purifiés chez <u>Tradescantia</u>	
1° Conditions expérimentales.....	98
2° Résultats biochimiques.....	99
3° Interprétation des résultats.....	99

Chapitre IV - Etudes physiologiques à l'aide d'inhibiteurs spécifiques du métabolisme chez les plantes normales et mutées

- A - Effets biochimiques de quelques inhibiteurs sur les plants normaux
- 1° Inhibiteurs de la glycolyse..... 102
 - 2° Autres cas d'inhibitions (de la synthèse d'ATP, du glycocolle et d'ARN). 103
- B - Inhibition comparée de la photophosphorylation chez les plants d'Orge normaux et mutés

TROISIEME PARTIE - RECHERCHES SUR LE ROLE DES AMINO-ACIDES DANS LA REGULATION DU FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE

Chapitre I - Double effet de l'absorption cellulaire de L-leucine sur l'appareil photosynthétique chez l'Orge

- A - Etude biochimique..... 111
- B - Etude histochimique..... 115

Chapitre II - Effets inhibiteurs de la L-leucine et de la D-L-Aza-4-leucine sur l'appareil photosynthétique de l'Orge et de l'Arabidopsis

- A - Etude chez l'Orge (normaux et mutés) (utilisation de leucine-(U)-¹⁴C)..... 116
- B - Action chez Arabidopsis (normaux) (utilisation de leucine-(U)-¹⁴C)..... 119

Chapitre III - Action de la L-leucine sur la stimulation du verdissement des plants d'Orge et d'Arabidopsis normaux et mutés

- A - Etude chez l'Orge..... 122
- B - Etude chez l'Arabidopsis (utilisation de leucine-(U)-¹⁴C)..... 124

Chapitre IV - Effets de la leucine et de l'aza-leucine sur l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge (normaux et mutés)

- A - Rôle de la leucine - Influence de la dose... 128
- 1° Expériences in vivo..... 128
 - 2° Expériences in vitro..... 128
 - 3° Etudes histochimiques..... 128
- B - Mécanisme d'inhibition de l'activité phosphatasique par la leucine in vitro..... 130
- C - Effets de la leucine et l'aza-leucine in vivo sur l'activité phosphatasique de plants normaux et mutés..... 132
- D - Etude histochimique du rôle de la leucine sur l'activité phosphatasique et ATPasique
- 1° Phosphatases alcalines..... 136
 - 2° ATPase^s alcalines..... 136

...

Résultats Généraux et DISCUSSION.....	137
CONCLUSION.....	145

BIBLIOGRAPHIE

HORS TEXTE	Tableaux numériques
	Figures
	Planches photographiques

Vu.

membres du jury :

PACHECO

EBRETON

C. COSTES (lettre jointe)

Leclercq

Vu et approuvé.

Le Directeur de l'U.E.R.
de CHIMIE-BIOCHIMIE

Daniel Paulin

Vu et accordé le permis d'imprimer.

Lyon, le 5 mai 1972

Le Président de l'Université
Claude Bernard,

J.B.
J. BOIDIN

